

**Evaluación del efecto antagonista del filtrado crudo de la
cepa *UdeA0106* sobre *Meloidogyne* spp. *in vitro***

Harol Hernando Pavas Castañeda

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título
Biólogo.**

Tutor:

Nadya Lorena Cardona Bustos, M.Sc., Ph.D

**UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
INSTITUTO DE BIOLOGÍA
2012**

DEDICATORIA

Principalmente a mi mamá, quien es la persona que siempre ha luchado para que yo alcance mis triunfos y quien ha dado todo en su vida para verme crecer. A mis maestros quienes me han brindado sus conocimientos, y por ultimo a mis amigos por los que pase una de las mejores etapas de mi vida.

Dios muchas gracias

Harol Pava Castañeda.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora, que me brindó todos sus conocimientos, me apoyó y confió en mí para realizar este trabajo. Profe, muchas gracias y discúlpeme que sé que a veces no fui el mejor.

NADYA LOREANA CARDONA BUSTOS. Docente Instituto de Biología.
Universidad de Antioquia

A mis compañeros del Laboratorio Bioma, quienes me dieron ánimo en los momentos que falle, me asesoraban y me brindaron su amistad. Nunca me sentí solo. Gracias muchachos.

PAMELA, JENNY, DAVID, BIBI, CLAUDIA, ANDRES y el profe CAMILO y a todos los demás integrantes.

A mis amigos, por que siempre estuvieron conmigo en este proceso y por que más que compartir son mis socios los parceros del alma.

ANGY, JUAN, STEPHY, CARO, PAULITA, MILE, SANDRA, YULI, CHEVY, JUDITH y a todos los parceros que me faltan por mencionar pero que saben que se les quiere.

TABLA DE CONTENIDO

	Pag
RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	10
1. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA.	13
1.1 Nematodos.....	13
1.2 Nematodos parásitos de plantas.....	13
1.3 El genero <i>Meloidogyne</i> spp.....	14
1.3.1 Historia.....	14
1.3.2 Biología y Distribución.....	15
1.3.3 Interacción Nematodo-Planta.....	17
1.3.4 El ciclo de vida.....	17
1.4 Sintomatología en la planta.....	18
1.5 Control de la Enfermedad.....	19
1.6 Hongos nematófagos.....	20
1.6.1 Cepa <i>UdeA0106</i>	21
2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	23
3. HIPOTÉISIS	24
4. OBJETIVOS.....	24
4.1 OBJETIVO GENERAL	24
4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	24
5. JUSTIFICACIÓN	25
6. METODOLOGIA POR OBJETIVOS.....	26
6.1 ACTIVIDADES PREVIAS AL MONTAJE DE LAS PRUEBAS DE PATOGENICIDAD.....	26
6.1.1 Establecimiento e Identificación de la población de <i>Meloidogyne</i> spp.....	26
6.1.2. Reactivación de la cepa <i>UdeA0106</i>	27

6.2. Objetivo 1: Establecer el mejor medio de cultivo para la realización de las pruebas de patogenicidad de los filtrados crudos, sobre los estadios de <i>Meloidogyne</i> spp.	28
6.3. Objetivo 2: Determinación del efecto del filtrado de la cepa UdeA0106 sobre los huevos de <i>Meloidogyne</i> spp.	29
6.4. Objetivo 3: Determinación del efecto del filtrado de la cepa UdeA0106 en la actividad de los estadios J2 de <i>Meloidogyne</i> spp.	30
6.5. Análisis estadístico.	31
Tabla 2. Esquema de los tratamientos en las pruebas de patogenicidad con el filtrado de la cepa <i>UdeA0106</i>	32
7. RESULTADOS	33
7.1. Identificación morfológica de las especies de <i>Meloidogyne incognita</i> y <i>Meloidogyne javanica</i> a través de cortes perineales.	33
7.2. Establecimiento del mejor medio de cultivo para la realización de las pruebas de patogenicidad	34
Tabla 3. Anova con los promedios de eclosión entre los diferentes medios de cultivo para la cepa <i>UdeA0106</i>	35
7.3. Efecto antagonista del filtrado de la cepa <i>UdeA0106</i> sobre los huevos de <i>Meloidogyne incognita-javanica</i>	36
Tabla 4. ANOVA para determinar diferencias en los promedios de eclosión de los huevos <i>M. incognita-javanica</i> durante su periodo de exposición y en cada uno de los tratamientos.	37
Tabla 5. Acción de diferentes concentraciones del filtrado de la cepa <i>UdeA0106</i> en la inhibición de la eclosión de huevos de <i>M. incognita-javanica</i>	38
7.4. Efecto antagonista del filtrado de la cepa <i>UdeA0106</i> sobre los estadios J2 de <i>Meloidogyne incognita-javanica</i>	40
Tabla 6. ANOVA para determinar diferencias significativas en los promedios de mortalidad de J2 de <i>M. incognita-javanica</i> durante su periodo de exposición y en cada uno de los tratamientos.	41
Tabla 7. Acción del filtrado de la cepa <i>UdeA0106</i> sobre los estadios J2 del complejo <i>M. incognita-javanica</i>	43
8. DISCUSIÓN	43
9. CONCLUSIONES	49
10. RECOMENDACIONES	50
11. BIBLIOGRAFÍA	51

Lista de Tablas

Tabla 1. Efectos de metabolitos secundarios a partir de filtrados de cultivos de hongos anamórficos.	22
Tabla 2. Esquema de los tratamientos en las pruebas de patogenicidad con el filtrado de la cepa <i>UdeA0106</i>.	32
Tabla 3. Anova con los promedios de eclosión entre los diferentes medios de cultivo para la cepa <i>UdeA0106</i>.	35
Tabla 4. ANOVA para determinar diferencias en los promedios de eclosión de los huevos <i>M. incognita-javanica</i> durante su periodo de exposición y en cada uno de los tratamientos.....	37
Tabla 5. Acción de diferentes concentraciones del filtrado de la cepa <i>UdeA0106</i> en la inhibición de la eclosión de huevos de <i>M. incognita-javanica</i>.....	38
Tabla 6. ANOVA para determinar diferencias significativas en los promedios de mortalidad de J2 de <i>M. incognita-javanica</i> durante su periodo de exposición y en cada uno de los tratamientos.....	41
Tabla 7. Acción del filtrado de la cepa <i>UdeA0106</i> sobre los estadios J2 del complejo <i>M. incognita-javanica</i>.....	43

Lista de Graficas

- Grafica 1.** Promedio de eclosión de huevos de *M. incognita-javanica* en los medios de cultivo PDB, Extracto de Malta y Extracto de Levadura.....35
- Grafica 2.** Valores de pH para los diferentes medios de cultivo de la cepa UdeA0106.....36
- Grafica 3.** Promedio de huevos eclosionados con su desviacion estandar. Las barras representas el promedio total de J2 que eclosionaron al segundo, cuarto y sexto día de incubación. Las letras indican diferencias significativas con la prueba de Tukey ($p < 0.05$).....38
- Grafica 4.** Efecto del promedio de filtrado de la cepa *UdeA0106* sobre la eclosión de los huevos de *Meloidogyne incognita-javanica*. La grafica muestra que aunque hay un incremento en el numero de larvas, sin embargo, el tratamiento al 100% y las diluciones al 90% y al 70% lograron mantener un porcentaje de J2 muy bajo en comparacion con los controles.....39
- Grafica 5.** Mortalidad de J2 de *M. incognita-javanica* durante el periodo de incubación con los tratamientos del filtrado de la cepa *UdeA0106*. No se tubo en cuenta el control de ADE para estos valores de medias. Letras diferentes indican diferencias significativas detectadas por la T de tukey ($p < 0.05$).....42

Lista de Figuras

Figura 1. Cortes perineales de hembras de *Meloidogyne incognita*. Las figuras A y B son fotografías de cortes de hembras extraídas de la población de estudio, C y D son los esquemas de comparación de la huella perineal de *M. incognita*.....33

Figura 2. Cortes perineales de hembras de *Meloidogyne javanica*. A y B se observa la presencia del surco transversal en el corte perineal de una hembra de la población y el esquema. C y D son fotografías online de cortes de *M. javanica*.....34

Figura 3. Huevos deformados por el filtrado de la cepa *UdeA0106*.....40

RESUMEN

Los nematodos del genero *Meloidogyne* spp. son parásitos obligados de plantas, que atacan cultivos agrícolas de importancia económica a nivel mundial. El manejo implementado para esta plaga, se basa en el uso de químicos y practicas culturales. Actualmente, el desarrollo de nuevas alternativas más amigable con el ambiente, han llevado a la búsqueda de microorganismos que antagonicen nematodos fitoparásitos. La utilización de compuestos naturales producidos por hongos nematófagos es una nueva área por explorar. Por lo anterior, en este trabajo se evaluó el efecto antagonista del filtrado crudo del hongo hyphomycete cepa *UdeA0106*, sobre los estadios larval y de huevo, de especies del genero *Meloidogyne*. Los estadios de huevos y J2, fueron expuestos a seis diluciones del filtrado 100%, 90%, 70%, 50%, 25% y 10% al igual que dos controles de agua y medio estéril, por 7 y 3 días respectivamente. La inhibición en la eclosión de los huevos, mostro diferencias significativos ($p < 0,05$) entre los tratamientos y los controles y durante el tiempo de exposición. Además, observaciones microscópicas, indican la alteración en el desarrollo de aquellos huevos que fueron tratados con el filtrado, en comparación con los controles. Para los J2 se observó un porcentaje de mortalidad del 96,8% con el filtrado puro y de 94,8% y 90,4% con las diluciones al 90% y al 70% respectivamente, después de 72h de exposición. De acuerdo con los resultados,, se encontró un efecto inhibitorio en la eclosión de huevos y un alto porcentaje en la mortalidad de los J2, lo que sugiere la presencia de algunas sustancias en el filtrado de la cepa *UdeA0106* que afectan la viabilidad del nematodo.

Palabras claves: Control biológico, *Meloidogyne* spp., hongos nematofagos, Filtrados de hongos nematófagos.

INTRODUCCIÓN

Los nematodos, son gusanos no segmentados muy pequeños y mas abundantes y diversos de los grupos de fauna que habitan todos los suelos. Estos se alimentan de un amplio rango de organismos y dependen de finas películas de agua para su desplazamiento. Debido a esto, su actividad es controlada en gran parte por las condiciones biológicas y físicas del suelo (Yeates & Bongers, 1999).

Una de las zonas menos comprendida y donde se da gran parte de las interacciones del suelo, es la zona que rodea la raíz; conocida como la rizósfera. La mayoría de organismos que se encuentran en la rizósfera están representados por los principales grupos de: bacterias, actinomycetes, hongos, protozoos y microalgas (Al Abed, 2008). Dentro de la microfauna presente, los nematodos y ácaros son microorganismos de gran importancia, ya que se encuentran en proporciones significativas en suelos con raíces en comparación de suelos sin raíces (Kerry, 2000).

Todos los nematodos fitoparásitos, se encuentran en esta zona para poder llegar a su hospedero; se alimentan de las fuentes de carbono y estimulan la exudación de compuestos de las raíces, que aumentan la actividad microbiana en la rizósfera, lo que a su vez, afecta la actividad de microorganismos benéficos y/o patógenos para la planta (Kerry, 2000., Piskiewicz *et al*, 2008).

En las zonas tropicales y subtropicales, las especies de nemátodos del genero *Meloidogyne*, son la peste con mayor nivel de daño que ataca un amplio rango de especies de plantas. En países tropicales (Sasser, 1979), de los nematodos fitoparásitos, los nematodos del nódulo de la raíz, son causantes de la perdida de cultivos alrededor de un 15%, mientras que entre un 50% a 80% de perdidas en cultivos de vegetales, son comúnmente reportadas por especies de este género (Siddiqui, 2000).

Además, nemátodos formadores de nódulos o agallas del género *Meloidogyne* spp, son de gran importancia económica, ya que representan un limitante en la productividad y la calidad de la agricultura (Sasser & Carter, 1985), se estima que son responsables de más del 90% de todos los daños causados por estos microorganismos en todo el mundo (Castagnone-Sereno, 2002) y la severidad del daño causado puede ser por especie específica, por la variedad del hospedero, la rotación del cultivo, la estación y tipo de suelo (Greco *et al.* 1992 citado en Perry *et al.*, 2010).

Dependiendo de las condiciones climáticas, estado del cultivo, la especie de nematodo, su nivel de densidad, y el factor económico, varias estrategias pueden ser empleadas para minimizar el nivel de daño causado por estos organismos (Ploeg, 2008., citado en Kaşkavalci *et al.*, 2009). Sin embargo, para implementar una estrategia de manejo integrado de plagas, es necesario conocer el comportamiento, estructura poblacional, patrones de evolución y caracteres de identificación que permitan hacer uso de diferentes herramientas de control que regulen la densidad poblacional de los nematodos fitoparásitos (Farguette *et al.*, 2009).

El uso de nematicidas químicos ha sido una fuerte herramienta para el control de nemátodos fitoparásitos. Sin embargo, prácticas de control cultural, tales como la rotación de cultivos, métodos de solarización o variedad de cultivares resistentes se han ido implementado para prevenir el ataque de esta plaga. No obstante, el control biológico que se hace para manejar este patógeno, se hace a través de aplicaciones de microorganismos antagonistas de *Meloidogyne* spp. o por los compuestos que produzcan estos microbios (Ashraf & Khan, 2010. Citado en Hashem & Abo-Elyousr, 2011).

Una alternativa para el manejo estratégico de nematodos fitoparásitos, es el uso de hongos nematófagos los cuales se encuentran ampliamente distribuidos en el suelo y son asociados constantemente como biocontroladores de nemátodos en la naturaleza (Mukhtar & Pervaz, 2003). Se sabe que parasitan directamente los nemátodos formando dispositivos de hifas ramificadas pegajosas, redes, nudos,

anillos de constricción o por la producción de compuestos nematoestáticos o nematicidas producidos a partir de sus metabolitos secundarios y por enzimas que afectan la viabilidad de los huevos del nematodo (Cayrol *et al.* 1989., Mukhtar & Pervaz, 2003., Meyer *et al.* 2004., Lopez-Llorca *et al.* 2008., Ayatollahy & Fatemy, 2010).

Los productos derivados de hongos con actividad toxica o propiedades enzimáticas son prometedoras fuentes de nuevos productos químicos orgánicos para el manejo integrado de los nemátodos (Regaieg *et al.* 2010, Cayrol *et al.*, 1989). Se ha encontrado que algunos hongos nematófagos, parasitan directamente a su hospedero o secretan metabolitos secundarios que afectan la viabilidad de uno o más estadios del nematodo. Debido a esto, la búsqueda de compuestos nemato-tóxicos o antagonistas, en filtrados de cultivo de hongos, se ha intensificado considerablemente en los últimos años, debido a la cantidad de toxinas, enzimas o compuestos que pueden derivarse de sus metabolitos (Regaieg *et al.* 2010)

Este trabajo de investigación, se hace con el fin de determinar el efecto antagonista *in vitro* del filtrado crudo del hongo hyphomycete cepa *UdeA0106* sobre los estadios de huevos y larvas J2 de nemátodos del genero *Meloidogyne* spp., ya que se ha encontrado que esta cepa presenta características de patogenicidad sobre este género de nematodos fitoparásitos.

1. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA.

1.1 Nematodos

El phylum Nemata o Nematoda comprende especies de nematodos que son parásitos del hombre, animales y de plantas y especies de vida libre que se encuentran en el suelo, en agua dulce y habitas marino. Posee dos clases: Adenophorea y Sercenentea, y se estima que hay alrededor de 500 000 a 1 000.000 especies, de las cuales se han descrito 25 000, y de estos se estima que 15 000 son parásitos tanto de plantas como de animales (Numbers of Living Species in Australia and the World, 2009).

1.2 Nematodos parásitos de plantas.

Los nemátodos fitoparásitos pueden ser de vida libre o endoparásitos migratorios y pueden alimentarse como ectoparásitos o endoparásitos del sistema radicular. Son causantes de millonarias pérdidas en una gran variedad de cultivos de importancia económica en todo el mundo (Koenning *et al.* 1999. Citado en Al abed Al kader, 2008., Kerry, 2000). Anualmente la perdida de cultivos a escala mundial atribuida a nemátodos parásitos de plantas está estimada en un rango del 5% al 12%, reduciendo la producción en millones de toneladas cada año (Kaşkavalci *et al.*, 2009). Los nematodos de este grupo se distinguen principalmente por la presencia de un estile en su parte bucal el cual usa para penetrar la pared celular y absorber los nutrientes de su hospedero. Estos nematodos, pueden actuar de diferentes maneras en el desarrollo y manifestación de la enfermedad; ya que pueden ser vectores de virus u otros parásitos, causantes de lesiones o heridas, alterando los procesos fisiológicos de su hospedero, disminución de la resistencia y modificando los procesos biológicos de la rizósfera; debido a que pueden estimular la cantidad de exudados radicales en el suelo, lo que conlleva a que la

planta quede más expuesta al ataque de otros patógenos (Bardgett *et al.* 1999; Brussaard *et al.* 2001; Desaegeer *et al.* 2004 citado en Al abed Al kader, 2008).

1.3 El genero *Meloidogyne* spp.

1.3.1 Historia.

El género *Meloidogyne*, es de origen griego y significa (hembra con forma de manzana); también son conocidos como nemátodos del nódulo de la raíz o nemátodos formadores de agallas. El primer reporte ilustrado de la enfermedad del nódulo de la raíz, apareció a mediados del siglo XIX por el monje Miles Joseph Bekerley (1855) quien detecto por primera vez la presencia de agallas en las raíces de pepino en su invernadero causadas por nematodos (Perry *et al.* 2010.). En Sur América, en la provincia de Rio de Janeiro, Brasil, Jobert (1877) encontró en arboles de café enfermos, raíces fibrosas con presencia de agallas, algunas de ellas terminales, otras a lo largo de la raíz y, otras, más escasas en las raíces laterales. Pero Jobert, no tuvo tiempo de realizar más observaciones y publicar un informe acerca de la fitopatología del café; fue Göldi en 1887 quien público un informe detallado acerca de la enfermedad de los cafetales y denominó a la especie del nematodo del café como *Meloidogyne exigua*. De ahí en adelante, aparecieron sinonimias para el género y la especie como *Heterodera radícícola* y *Heterodera marioni* hasta que en 1949 Chitwood, hizo una descripción de las cuatro especies del genero ampliamente distribuidas y más reportadas en vegetales. *M. hapla*, *M. javanica*, *M. incognita* y *M. arenaria* (Sasser & Taylor, 1983, Perry *et al.* 2010).

Hasta Junio del 2009, el genero tenia validadas 97 especies, pero la mayoría del conocimiento que se tiene sobre el genero *Meloidogyne* spp. se basa en las cuatro especies de mayor importancia económica, amplia distribución geográfica y el gran número de plantas que parasitan: *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica*; *M. hapla* (Eisenback & Hunt, 2009).

Sin embargo, cabe destacar que en la actualidad, se están utilizando nuevas tecnologías que han proporcionado nuevas herramientas para la identificación de especies. Se han utilizado los fenotipos isoenzimáticos, utilizando el SDS-PAGE de los extractos de proteína cruda y tinciones histoquímicas para esterasas no específicas, superóxido dismutasa, la malato deshidrogenasa y transaminasa glutamato oxalacetato; de las cuales, las esterasas y la malato deshidrogenasa, son comúnmente utilizadas como factor discriminante en la identificación de las especies de *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* y *M. hapla*. Además, el desarrollo de marcadores moleculares específicos para cada especie usando variaciones en el genoma de cada especie acoplado a técnicas de PCR, han facilitado eliminar las ambigüedades del sistema de identificación taxonómico tradicional y la descripción de las nuevas especies.

1.3.2 Biología y Distribución.

Los nemátodos del género *Meloidogyne*, se encuentran en áreas templadas, tropicales y subtropicales, atacando un amplio rango de plantas de importancia agrícola a nivel mundial (Kiewnick & Sikora, 2005., Al abed Al kader, 2008., Caillaud *et al.* 2007.). Son patógenos biotróficos obligados, que han desarrollado estrategias de infección en varias especies de plantas de manera similar, probablemente por alteraciones a nivel de la pared celular de la planta (Caillaud *et al.* 2007). Un ejemplo de esta interacción, se presenta en la hembra; esta se desarrolla en un estado de endoparasitismo, provocando la ruptura de la epidermis y el corte radical, donde permanecen embebidas dentro de una agalla o nódulo (Kerry, 2000., Khan *et al.* 2005). Estas alteraciones, producen un desequilibrio en los mecanismos de absorción de nutrientes y agua en la planta (Khan *et al.* 2005). Otro aspecto ligado a estos nematodos fitoparásitos, es la presencia de un estilete contráctil que se encuentra unido a tres glándulas esofágicas, el cual es usado para penetrar o perforar la pared celular y liberar secreciones esofágicas al tejido radicular, para poder absorber nutrientes de la planta (Caillaud *et al.* 2007). Las hembras, los machos y los juveniles de *Meloidogyne* spp., poseen estiletes que

consisten en una punta cónica, una columna derecha y tres nódulos. Los machos son de cuerpo vermiforme más engrosados que los juveniles y de poca movilidad; en especies con reproducción por partenogénesis mitótica, estos son muy escasos. Los juveniles son de cuerpo vermiforme redondo en la parte anterior y acusado en la parte de atrás; este es el estadio infectivo, el cual se puede desplazar grandes distancias (40-100cm) verticalmente, dependiendo el tipo de suelo, en buscas de nuevas raíces para parasitar. Las hembras tienen cuerpos en forma de pera y son sedentarias. Sin embargo, la región anterior posee músculos que le permiten girar para alimentarse de una o varias células gigantes (Sasser & Taylor, 1983., Perry *et al.* 2010).

La forma de reproducción de las especies de *Meloidogyne* spp. es principalmente por apomixis; debido a su corto ciclo de vida, altas tasas de reproducción y a un importante incremento de patógenos de cultivos. Sin embargo, se han descrito tres tipos de reproducción en el género: Por anfimixis; en donde un espermatozoide de un macho fecunda un oocito de la hembra y ocurre la meiosis, por automixis, que es una partenogénesis meiotica facultativa, que ocurre en ausencia del macho; de esta manera, la meiosis ocurre dentro del oocito y los dos núcleos quedan con el número de cromosomas reducido. Por último, la apomixis, que es un partenogénesis mitótica obligada, cuando el macho no se desarrolla, en el cual uno de los núcleos formados durante la división mitótica se degrada dentro del oocito y el otro asume como predecesor de un nuevo embrión.

El modo de reproducción por apomixis, es encontrado en muchas especies con un amplio rango de distribución geográfica y de gran impacto agronómico. Esto puede ser explicado posiblemente como un mecanismo que ha desarrollado las especies recientemente y que ha sido extendido por la agricultura (Trudgill & Blod, 2001. Citado en Perry *et al.* 2010., Fargette *et al.* 2009).

1.3.3 Interacción Nematodo-Planta.

Los juveniles de los nematodos del nódulo de la raíz se mueve intercelularmente una vez penetran las paredes celulares de la raíz a nivel de la calíptrá, migrando a través del cortex de la raíz, hasta ubicarse en la parte superior del cilindro vascular. Ellos se establecen permanentemente en un sitio de alimentación, en la zona de diferenciación celular de la raíz (cerca al meristemo), donde inducen la división celular sin citogénesis en las células hospederas. Esto da a lugar a la formación de células multinucleadas denominadas células gigantes. Las células que se encuentran alrededor de la célula gigante, siguen dividiéndose y aumentando, por lo que se da la formación de las agallas o nódulos en la raíz. (Williamson & Hussey, 1996., Williamson & Gleason, 2003).

1.3.4 El ciclo de vida.

Las hembras, forman una masa gelatinosa compuesta de una matriz de glicoproteínas, que es producida por la glándula rectal en la hembra, dentro de la cual deposita sus huevos para darles protección de depredadores y ambientes extremos. Las masas de huevos, pueden ser encontradas en la superficie de las agallas de la raíz o en su interior. Dentro del huevo, se da la embriogénesis y se forma el primer estadio juvenil, que luego muda al estado infectivo J2. La eclosión del J2 del huevo depende de la temperatura y la humedad principalmente. Sin embargo, hay otros factores que pueden afectar la respuesta de eclosión; debido a lo anterior, la eclosión del J2 ocurre cuando las condiciones ambientales son favorables para el desplazamiento y la ubicación de su nuevo hospedero. Posterior a la eclosión, el los segundos estadios larvales infectivos (J2), penetran la raíz alrededor de la calíptrá y estos se desplazan por los espacios intercelulares hasta ubicarse en un sitio permanente de alimentación en los haces vasculares de la planta. La alimentación de los J2 a partir de las células del protoxilema y del profloema, induce la diferenciación de estas células enfermas, llamadas células gigantes. Una vez formada la célula gigante, los J2 pasan a un estado sedentario,

comienzan a crecer y a engrosar su cuerpo. La formación de las células gigantes, bloquea los vasos del xilema y a su vez induce la división de células corticales, lo que eventualmente resulta en la formación de la típica agalla. Posteriormente, los J2 mudan a al tercer y cuarto estadio (J3 y J4). Aproximadamente a los 14 días, en la tercera muda se da una dilatación de las glándulas esofágicas y las células del primordio genital se dividen dando una diferenciación sexual entre machos y hembras. Para la cuarta muda, los machos se encuentran totalmente desarrollados y las hembras han adquirido una forma piriforme o de pera. El tiempo que demora para ocurrir la muda entre el J3 y el J4 para convertirse en adulto es de 4 a 6 días. En los estadios J3 y J4 hay ausencia de estilete y no se alimentan. Los machos adultos migran de la raíz al suelo. Las hembras maduran y forman sacos para la ovoposición de los huevos. (Taylor & Sasser, 1983., Volcy, 1998., Perry *et al.* 2010.)

1.4 Sintomatología en la planta.

Los síntomas foliares que pueden causar los nemátodos fitoparásitos en una planta enferma, puede ser confundido con síntomas asociados a otros factores de estrés tanto bióticos como abióticos. Debido a esto se recomienda siempre hacer una identificación completa de la presencia o ausencia de nemátodos fitoparásitos y otros patógenos del suelo.

La sintomatología que produce los nemátodos del género *Meloidogyne* en la planta, induce manifestaciones tanto en la porción aérea como en el sistema radicular (Coyne *et al*, 2007).

La formación de nódulos o agallas a lo largo de la raíz es el síntoma más contundente de la infección por nemátodos del género *Meloidogyne*; sin embargo, la disminución en el tamaño de la raíz al igual que la disminución en la cantidad de raíces laterales, y la cantidad de pelos radiculares, son síntomas que alteran la arquitectura de la raíz en la planta. Al mismo tiempo, los haces vasculares de la raíz se destruyen, lo que impide el flujo normal de agua y nutrientes de la raíz a

toda la planta. Por último, la infección puede producir necrosamiento del tejido y la muerte de la raíz; lo que conlleva al declinamiento de la planta (Taylor & Sasser, 1983., Coyney *et al*, 2007).

En la parte aérea de la planta, las alteraciones causadas en la raíz se ven reflejadas en la disminución del crecimiento, marchitez, clorosis foliar, poco follaje, reducción en la calidad y cantidad de frutos y semillas y bajo rendimiento del cultivo. En cultivos grandes, se puede observar un crecimiento deprimido por parches (Coyne *et al*. 2007).

1.5 Control de la Enfermedad.

Históricamente, el manejo de nematodos se ha hecho por la introducción de plantas resistentes, rotación de cultivos, prácticas culturales o nematicidas químicos (Chitwood, 2002). Actualmente el manejo integrado de estos organismos fitoparásitos, se hace de manera conjunta utilizando métodos de control cultural, químico, microbiológico, y más recientemente se ha planteado como método alternativo, el uso de productos naturales que son más seguros que los compuestos sintéticos. Otras alternativas que se han propuesto para el control biológico, es el uso de antagonistas microbianos entre los que han sido evaluados hongos que parasitan huevos, hongos nematófagos, bacterias y nematodos predadores (McSorley *et al*. 2008; Burkett-Cadena 2008; Kiewnick & Sikora, 2006; Akhtar & Malik, 2000).

En la actualidad, la utilización de químicos en el manejo de nematodos fitoparásitos, ha disminuido debido al riesgo que representan para la seguridad ambiental y la salud pública (Akhtar & Malik, 2000). En países desarrollados, el uso del bromuro de metilo está prohibido desde el año 2005; este que fue sacado del mercado, lo cual ha provocado la búsqueda de otras alternativas para el control de nemátodos (Oka, 2010).). Además, el control químico de nemátodos implica el uso de productos persistentes con una amplia actividad, lo cual puede

perturbar completamente las redes tróficas del suelo. Por lo tanto, muchos esfuerzos están siendo direccionados a mejorar los sistemas de control biológico (Piskiewicz *et al.* 2008). Es por esta razón, que muchas estrategias para el manejo integral de nemátodos del género *Meloidogyne* spp actualmente están siendo investigadas para buscar soluciones amigables con el ambiente y que sean efectivas contrarrestando la enfermedad. (Nico *et al.* 2004 citado en Burkett-Cadena *et al.* 2008).

En Colombia los cultivos que se ven afectados por nematodos de este género principalmente son: Tomate, Lulo, Papa, Uchuva, Papa, Pimentón, Algodón, Platano y una gran variedad de especies de importancia en floricultivos. Actualmente los planes de manejos que han implementado los agricultores para el control de esta plaga, se hacen en base a nematicidas químicos, que debido a su persistencia en el ambiente y en los suelos se han convertido en un problema fitosanitario y de salud pública (Cardona *et al.* 2008).

1.6 Hongos nematófagos.

Debido a que los hongos constituyen aproximadamente el 80% de la biomasa del suelo. Éstos ocupan una posición dominante y muestran un gran potencial como agentes biocontroladores, Algunos antagonistas que reducen la densidad poblacional de nemátodos corresponden a Hongos patógenos/parásitos de huevos, hongos endoparásitos, hongos predadores, hongos parásitos/patógenos de hembras y endomicorrizas. (Sikora, 1992). Estos organismos que pueden crecer en la rizósfera y proveen una importante línea de defensa para la raíz contra el ataque de patógenos y son ideales para el uso como agentes biocontroladores (Siddiqui & Mahmood, 1996; Sikora 1992). Los principales hongos utilizados en el control de nemátodos de la raíz (tabla 1).

Por otra parte, compuestos derivados de hongos con actividad toxica o propiedades enzimáticas, son prometedoras fuentes de nuevos productos químicos orgánicos para el manejo integrado de los nematodos (Regaieg *et al.*

2010, Cayrol *et al.*, 1989). Se ha encontrado que algunos hongos nematófagos parasitan directamente a su hospedero, o secretan metabolitos secundarios que afectan la viabilidad de uno o más estadios del nematodo. Debido a la cantidad de toxinas, enzimas o compuestos naturales que pueden derivarse de los hongos, en los últimos años se ha intensificado considerablemente, la búsqueda de compuestos nemato-tóxicos, o antagonistas en filtrados de cultivo de hongos, , (Regaieg *et al.* 2010).

Estos, han mostrado diferentes niveles de actividad nematicida, en varios grupos tróficos de nemátodos y esto ha sido reportado en la cantidad de metabolitos secundarios que se han descubierto (Al abed, 2008).

1.6.1 Cepa *UdeA0106*.

Cardona *et al.* (1997) reportó el hallazgo de un hongo hyphomycete parasitando huevos y otros estadios de las especies *Meloidogyne incognita* y *Meloidogyne javanica* en suelos de cultivos de café. Debido a que no se pudo dar una clasificación taxonómica dentro de los grupos de hongos conocidos en esa época, esta cepa se designó bajo el nombre de Cenicafé 9501. Posteriormente, por su gran potencial como biocontrolador. Cardona *et al.* (2008) determinó algunos genes candidatos en la patogenicidad de la cepa, sobre los estadios de *Meloidogyne* spp, dentro de los cuales se encontraba una serin proteasa, así como lipasas que podrían explicar la acción de este organismo sobre los estadios del nematodo. Posteriormente se han encontrado aislados entre ellos la cepa *UdeA0106* que presentan características macroscópicas y microscópicas, así como caracteres moleculares, compatibles con la cepa Cenicafé 9501 y que han mostrado un gran potencial como biocontroladores.

Tabla 1. Efectos de metabolitos secundarios a partir de filtrados de cultivos de hongos anamórficos.

HONGO	FUNCIÓN	RESULTADOS
<i>Verticillium leptobactrum</i>	Actividad nematocida y enzimas degradadoras de quitina.	Se observó que los filtrados de <i>V. leptobactrum</i> tenían un efecto sobre la movilidad de los J2 de <i>M. incognita</i> en las diluciones de 10 y 50% e inhibían la incubación de huevos después de 7 días de exposición con la dilución de 50%. Además, estudios de microscopía electrónica de barrido, demostraron alteraciones e inviabilidad en los huevos que fueron expuestos al tratamiento (Regaieg <i>et al.</i> 2010).
<i>Beauveria bassiana</i>	Actividad nematocida.	Las diferentes diluciones de <i>B. bassiana</i> , mostraron un efecto directamente proporcional al factor de dilución, sobre la incubación de huevos y la tasa mortalidad en los individuos de <i>M. hapla</i> . Al mismo tiempo, en ensayos de invernadero en plántulas de tomate se encontró una disminución en la densidad poblacional del suelo, al igual que la formación de agallas en las raíces de la planta también disminuyo (Liu <i>et al</i> , 2008).
<i>Verticillium chlamydosporium</i>	Actividad nematocida. Producción de la toxina Verticillin A, B y C	Se observó que las concentraciones de 80 y 100% inhibían la incubación de los huevos de <i>M. javanica</i> , y que el porcentaje de inhibición aumentada proporcionalmente con el tiempo de exposición. De igual manera se encontró que concentraciones más altas incrementaban la tasa de mortalidad de los J2 y que está a su vez era directamente proporcional al tiempo de exposición (Mukhtar & Pervaz, 2003).
<i>Trichoderma spp.</i>	Actividad nematocida. Trichodermin.	El caldo del cultivo de <i>Trichoderma spp.</i> pudo causar más del 90% de la mortalidad de dos especies de nematodos; <i>Panagrellus redivivus</i> y <i>Caenorhabditis</i>

		<i>elegans</i> . Además, mediante espectrofometría de masa se pudo identificar una sustancia denominada Trichodermin (Yang <i>et al</i> , 2010)
<i>Paecilomyces lilacinus</i> (Thom,1974) <i>Purpureocillium lilacinum</i> (Luangsa, 2011)	Actividad nematocida	En un estudio sobre las propiedades del filtrado de cultivo de <i>P. lilacinus</i> se encontró que el medio con extractos de malta, tenía un efecto sobre la producción de toxinas que atacaran nematodos y que esta era independiente del pH y la luz. De las 17 especies del estudio, las especies del género <i>Meloidogyne</i> fueron las más sensibles al filtrado (Cayrol <i>et al</i> , 1989).
<i>Verticillium lecanii</i> (<i>Lecanicillium</i> spp)	Actividad nematocida	Los aislados de <i>V. lecanii</i> exhibieron una alta actividad nematocida contra los huevos <i>Heterodera glycines</i> , ya que pudieron inhibir la embriogénesis en el huevo (huevos fertilizados pero sin desarrollo de juveniles) y en los huevos maduros evitaron la eclosión. Sin embargo no mostro ninguna inactivación de los juveniles J2 (Shinya <i>et al</i> , 2008).

2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

En Colombia, la mayoría de los agricultores utilizan plaguicidas químicos y otras prácticas culturales como control contra los nematodos del nódulo radical del género *Meloidogyne* spp. Debido a que estos compuestos son muy tóxicos y constituyen un problema ambiental y de salud pública, se buscan alternativas de control más amigables con el medio ambiente, tales como el uso de microorganismos biocontroladores o el uso de productos naturales que sean producidos por ellos.

El Hyphomycete UdeA0106 es un hongo anamórfico que ha mostrado ser un agente biocontrolador eficiente (Reporte interno, Laboratorio de Control Biológico y

Microbiología Aplicada BIOMA, 2009), pero hacen falta estudios que permitan ampliar el conocimiento acerca de la capacidad para producir componentes naturales que permitan su utilización en el manejo de poblaciones de nematodos del género *Meloidogyne*. Los resultados obtenidos, permitirán obtener datos para establecer métodos de control biológico y posibles alternativas de bioformulados de gran eficiencia, bajo costo y con grandes beneficios ecológicos.

3. HIPOTÉISIS

El filtrado crudo de la cepa *UdeA0106* tiene compuestos naturales que pueden tener un efecto antagonista sobre los estadios J2 y huevos de nemátodos fitoparásitos del genero *Meloidogyne* spp.

4. OBJETIVOS.

4.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto antagonista del filtrado crudo de un cultivo liquido de la cepa *UdeA0106 in vitro* sobre los estadios J2 y huevos de *Meloidogyne* spp.

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Establecer el mejor medio de cultivo para la realización de las pruebas de patogenicidad de los filtrados crudos, sobre los estadios de *Meloidogyne* spp.
- Determinar el efecto del filtrado crudo de la Cepa *UdeA0106* sobre el porcentaje de eclosión de los huevos de *Meloidogyne* spp.

- Evaluar el efecto del filtrado crudo de la cepa UdeA0106 sobre la mortalidad de los estadios J2 de *Meloidogyne* spp.

5. JUSTIFICACIÓN

En el trópico y el subtropico una de las grandes plagas que generan pérdidas millonarias en el sector agrícola son los nematodos fitopatógenos del genero *Meloidogyne*, conocidos como el nematodo agallador o nematodo del nódulo radical. Debido a que estos organismos presentan una gran variabilidad en su morfología, fisiología y tipos de hospederos, se necesitan estudios que permitan conocer más de su biología y a partir de esto se busquen alternativas para un manejo integrado de la enfermedad.

En la actualidad, la principal estrategia de control que se tiene para esta plaga , es el uso de insumos químicos, los cuales son muy persistentes y se han convertido en un problema de seguridad fitosanitaria y de salud pública. El uso de microorganismo biocontroladores o los compuestos derivados de ellos son una alternativa saludable ambientalmente para la problemática actual. Debido a los resultados previos obtenidos con la cepa UdeA0106, en relación con su capacidad biocontroladora sobre estadios de *Meloidogyne* spp., se hace necesario estudiar los posibles productos naturales, que podrían estar involucrados en los mecanismos de patogenicidad del hongo sobre el nematodo. Lo anterior, permitiría contar con información para la producción futura de biformulados, amigables con el medio ambiente.

6. METODOLOGIA POR OBJETIVOS

6.1 ACTIVIDADES PREVIAS AL MONTAJE DE LAS PRUEBAS DE PATOGENICIDAD

6.1.1 Establecimiento e Identificación de la población de *Meloidogyne* spp.

La población de nemátodos del genero de *Meloidogyne* spp. se incrementó bajo condiciones de invernadero en plántulas de tomate (*Solanum lycopersicon*, L) variedad Santa Clara. Para la multiplicación se contó con una población inicial extraída a partir de muestras de raíces de tomates y plántulas de crisantemo parasitadas con *Meloidogyne* spp. (Cardona *et al*, 2007). El inculo se incrementó sobre plántulas de Tomate sembradas en suelo estéril, autoclavado a 15 psi y 121°C por 1 hora (Leguizamón, 1994). Se tomaron las raíces que presentaron mayor presencia de nódulos y se lavaron con agua destilada estéril (ADE) y luego fueron cortadas finamente, posteriormente se le realizo un lavado con agitación manual durante 3 minutos en hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1,05%; el cual funciona como un agente extractor y recoge los huevos en suspensión acuosa con la ayuda de tamices. Posteriormente, se hizo otro lavado con ADE para retirar el exceso de hipoclorito y el sobrenadante final fue recogido en un beaker para ser vertido sobre las plántulas de tomate (Giraldo *et al*. 1997). Las plántulas que fueron inoculadas se dejaron en invernadero por un periodo de 45 a 60 días.

Para identificar las especies de *Meloidogyne* spp, se realizó una extracción de las hembras que se encontraban en las raíces que presentaban agallas. Estas eran lavadas, para luego realizar cortes transversales que permitieran obtener la parte posterior del cuerpo donde esta el patrón perineal utilizado para su identificación (Cardona *et al*, 2007).

6.1.2. Reactivación de la cepa UdeA0106

El hongo a trabajar pertenece al Laboratorio de Control biológico y Microbiología Aplicada “BIOMA” de la Universidad de Antioquia. Debido a que es almacenado en nevera en medio de cultivo sintético, fue preciso realizar su reactivación por medio de un previo montaje de pruebas de patogenicidad que permitieran estudiar su expresión.

La reactivación de la cepa *UdeA0106*, se hizo a partir de colonias en crecimiento de dos semanas en medio PDA acidificado (Papa Dextroxa Agar, Merk). A partir de estos cultivos, se preparó una solución de esporas con una concentración de $5,43 \times 10^8$ esporas por mililitro para realizar las pruebas de patogenicidad sobre huevos de *Meloidogyne* spp. Esta prueba consistía en la adición de 5mL de la suspensión de esporas a cajas Petri de 5 cm de diámetro, previamente esterilizadas, y 1mL de una solución que contenía de 200 a 300 huevos de *Meloidogyne* spp (Cardona *et al*, 2007). Luego de 5 días de incubación, los huevos que presentaban micosis se re-aislaban en medio PDA acidificado. Las colonias del hongo que se desarrollaron a partir de los huevos micosados, continuaron su crecimiento durante dos semanas y sirvieron como fuente de inóculo para el cultivo de la cepa *UdeA0106* en medio líquido.

Finalmente, para obtener el filtrado crudo de la cepa *UdeA0106*, se realizaron varios tamizajes. Primero, el cultivo se paso a través de una gasa estéril para retener toda la biomasa del hongo y luego el sobrenadante fue filtrado con un papel filtro Whatman No. 1 estéril. Posteriormente, el filtrado obtenido, se centrifugo a 5200 rpm por 15 minutos, luego se pasó a través de un filtro miliporo 0,2 μm con bomba de vacío. Por último, el filtrado se centrifugo a 13000rpm por 20 minutos para descartar esporas y micelio. El sobrenadante obtenido, se pasó por un filtro de fibra de vidrio para ser utilizado directamente en los experimentos (Yang *et al*, 2010., Regaieg *et al*. 2010, Al abed, 2008, Liu *et al*. 2008., Meyer *et al*, 2000).

6.2 Objetivo 1: Establecer el mejor medio de cultivo para la realización de las pruebas de patogenicidad de los filtrados crudos, sobre los estadios de *Meloidogyne* spp.

Con el fin de determinar cual sería el mejor medio para realizar las pruebas de patogenicidad sobre huevos y J2, se realizaron previamente ensayos sobre huevos de *Meloidogyne* spp. La evaluación de los medios se realizó sobre estos estadios, debido a que presentaban fases de desarrollo inmaduras y a su vez J2, de tal forma que los resultados, serán aplicables a las dos pruebas planeadas.

El hyphomycete *UdeA0106* fue cultivado en medio líquido sumergido utilizando cuatro medios diferentes para su crecimiento y a partir de estos obtener su filtrado crudo. Se utilizaron Erlenmeyer de 250mL con 100mL de medio líquido previamente esterilizado y autoclavado a 15psi, 15 minutos y 120°C. Los medios se sometieron a agitación permanente con una velocidad de 150rev/min durante 7 días a 25°C (Regaieg *et al.* 2010, Al abed, 2008, Liu *et al.* 2008, Cardona *et al.*, 2007). La unidad experimental fue la caja de Petri cada una con 100 huevos y los tratamientos consistieron en cuatro (4) medios a evaluar. Se utilizaron los medios Caldo Czapeck (Sacarosa 30g, NaNO₃ 3g, K₂HPO₄ 1g, MgSO₄-7H₂O 0,5g, KCl 0,5g, FeSO₄-7H₂O, 1000mL agua destilada), Caldo extracto de Malta (20g/L, Oxid), Caldo extracto de Levadura (20g/L, Oxid) y Caldo Papa Glucosa PDB (200g papa, 20g Glucosa, 1000mL) y para cada uno se registraron los valores de pH y se realizaron pruebas de patogenicidad evaluando el porcentaje de eclosión de los huevos de *Meloidogyne* spp.. Se consideró como el mejor medio de cultivo, aquel en donde eclosionaron la menor cantidad de huevos; mostrando con ello que el medio no interviene con el desarrollo del nematodo.

Con el fin de llevar un registro que pudiera afectar la eclosión de los huevos, o el desempeño del filtrado, una vez terminado el periodo de crecimiento de la cepa en cada cultivo, se registraron los valores de pH para cada medio

6.3. Objetivo 2: Determinación del efecto del filtrado de la cepa UdeA0106 sobre los huevos de *Meloidogyne* spp.

La extracción de las masas de huevos, se realizó a partir de las raíces de las plantas de tomate infestadas. Estas fueron desinfestadas en una solución de NaOCl al 1% por 5 minutos, se retiró el exceso de hipoclorito con abundante ADE, y se procedió a ser cortadas en trozos pequeños. Posteriormente fueron recogidas en frascos de vidrio con 200mL de NaOCl 1.05%, para proceder a ser agitadas durante 3 minutos. Después de la agitación, los huevos obtenidos, fueron separados por tamices y recogidos en un tamiz de 500 mesh. Con el fin de remover el exceso de hipoclorito, se les hicieron cuatro lavados con agua destilada estéril (ADE) y luego se pasaron por una solución de Oxitetraciclina al 0,1% por 10 minutos para desinfectar de bacterias que hubieran quedado presentes. Por último, con el fin de remover el antibiótico presente, se hicieron 5 enjuagues con ADE para ser utilizados directamente en el bioensayo (Meyer *et al*, 2004., Regaieg *et al*. 2010., Liu *et al*. 2008., Giraldo *et al*. 1997).

Los tratamientos consistieron en las concentraciones del filtrado: filtrado puro al 100% y diluciones del filtrado al 90%, 70%, 50%, 25% y 10% . Para los controles, se utilizaron ADE y medioescogido, estéril sin la cepa *UdeA0106*.. En cajas de Petri estériles de 5 ml se adicionaban la cantidad de mililitros de cada dilución por 1mL de solución de huevos (200 huevos/mL) y se completaba con ADE para un volumen final de 6ml (Tabla 2) (Cardona, 1994). La variable a evaluar fue el porcentaje de eclosión, el cual se se determinó haciendo observaciones de cada una de las cajas de Petri a los 2, 4 y 6 días de exposición. Se realizaron un conteos de los J2 que hubieran eclosionado. Adicionalmente, se hizo anotaciones de cambios en la morfología de los huevos expuestos al filtrado (Mukhtar & Pervaz, 2003., Meyer *et al*, 2000. Shinya *et al*, 2008., Liu *et al*, 2008).

Para el día 2, los datos de la dilución máxima (100%) se retiraron de los análisis estadísticos, debido a que los valores para el porcentaje de eclosión fue cero para todas las réplicas y esto no representaba ninguna variabilidad en los datos.

6.4. Objetivo 3: Determinación del efecto del filtrado de la cepa UdeA0106 en la actividad de los estadios J2 de *Meloidogyne* spp.

La extracción de los estadios J2 de *Meloidogyne* spp. se hizo a partir de muestras de suelo y raíces de las plántulas de Tomate por el método del tamiz-papel facial (Coyne *et al.* 2007). Las muestras se colocaron en bandejas con un tamiz y una hoja de papel facial, a lo cual se le adicionó 300 mL de agua, para posteriormente recoger el agua filtrada en beakers a las 24 y 48 horas, para ir concentrando los J2. Para lograr obtener los estadios de interés, sin residuos de suelo, la suspensión obtenida, se se hizo atravesar por un juego de tamices de 16, 32, 60 y 150 mesh. Posteriormente, con el fin de obtener la solución de trabajo de estadios para la prueba de patogenicidad, se ajustó la concentración de nematodos entre 150 a 200 larvas J2 por mililitro, los cuales fueron depositados en cajas de Petri estériles. (Cardona *et al.* 1994, Giraldo *et al.* 1997).

Debido a que en algunas ocasiones no fue posible lograr esta concentración, por el método descrito se obtuvieron J2 directamente a partir de huevos. Estos fueron extraídos por el método del hipoclorito de Na (Bibliografía), para posteriormente dispensarlos en cajas de Petri estériles, que fueron incubadas a temperatura ambiente de 3 a 5 días, para que, posterior a este tiempo, fueran recuperados los J2.

La unidad experimental fue la caja de Petri y el diseño experimental, fue complementamente aleatorizado y se realizaron Anovas de medidas repetidas en el tiempo, para determinar la presencia de diferencias significativas entre tratamientos. Estos, consistieron en la solución de los J2, sometidos a diferentes concentraciones del filtrado: suspensiones al 100%, 90%, 70%, 50%, 25% y 10%. Para los controles se utilizaron ADE y medio PDB estéril sin la cepa *UdeA0106*

(Mukhtar & Pervaz, 2003., Meyer *et al*, 2000. Shinya *et al*, 2008., Liu *et al*, 2008). Cada uno de los tratamientos constó de 5 repeticiones y la unidad experimental fue la caja de Petri de 5cm de diámetro estériles, en las cuales se adicionaban (200 huevos/mL y se completaba con ADE para un volumen final de 6mL Tabla 2 (Cardona, 1994).

La variable a evaluar, fue el porcentaje de J2 muertos a las 24, 48 y 72 horas de incubación.. Posterior al montaje, los tratamientos se dejaron en incubación a 25°C en un microscopio óptico invertido. Se designaron larvas muertas a aquellas que no respondían a un estímulo con una aguja hipodérmica o a un estímulo de luz y de esta manera se registra el número de J2 muertos de 100 contados (Cardona, 1994).

6.5. Análisis estadístico.

En el estudio se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado, con un intervalo de confianza del 95% y 5 repeticiones para cada tratamiento (Tabla 2). La unidad experimental consistía en una caja de petri con la dilución y la solución del estadio del nematodo. Las variables evaluadas fueron la eclosión de los huevos y mortalidad de los J2. Se hizo un análisis de varianzas ANOVA con medidas repetidas para determinar si hay un efecto significativo del tiempo y de las diluciones del filtrado sobre los estadios de *Meloidogyne* spp. De igual forma, se realizó un test de Tukey para determinar los tratamientos más efectivos y para determinar que medio de cultivo era más eficiente (Cardona, 1994., Trujillo *et al*, 2008).

Para cada una de las pruebas de patogenicidad, fue necesario hacer transformaciones a los datos, para que se ajustaran a los requerimientos de los supuestos de normalidad, homocedasticidad y el supuesto de esfericidad de Mauchly exigidos por el modelo estadístico de ANOVA con medidas repetidas.

Tabla 2. Esquema de los tratamientos en las pruebas de patogenicidad con el filtrado de la cepa *UdeA0106*.

TRATAMIENTO	Concentración	VOLUMEN (mL) de Huevos/J2	VOLUMEN (mL) DEL FILTRADO	VOLUMEN (mL) DE ADE
T1	100%	**	6,0mL	**
T2	90%	0,6mL	5,4mL	*
T3	70%	1,0mL	4,2mL	0,8mL
T4	50%	1,0mL	3,0mL	2,0mL
T5	25%	1,0mL	1,5mL	3,5mL
T6	10%	1,0mL	0,6mL	4,4mL
C1	CONTROL AGUA	1,0mL		5,0mL
C2	CONTROL MEDIO	1,0mL		5,0mL de medio

** El tratamiento de 100% la adición de 1mL de huevos o J2 se hizo recuperando los estadios en el mismo filtrado para no alterar la concentración. * El tratamiento 90% no se adicióno ADE para no alterar la dilución.

7. RESULTADOS

7.1. Identificación morfológica de las especies de *Meloidogyne incognita* y *Meloidogyne javanica* a través de cortes perineales.

Al realizar los cortes perineales se determinó que la población estaba conformada por un complejo de las especie de *Meloidogyne javanica* y *Meloidogyne incognita*. Su huella perineal se comparó con los esquemas y fotografías citadas en la literatura y disponibles en sitios virtuales (figura 1 y 2)

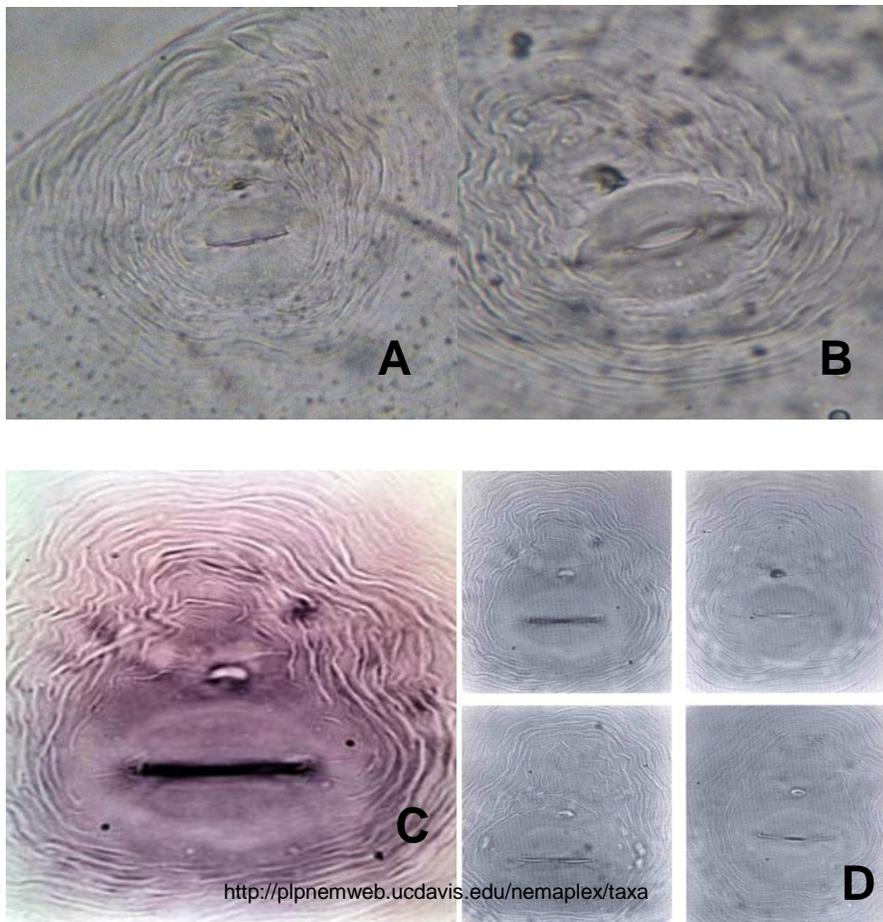


Figura 1. Cortes perineales de hembras de *Meloidogyne incognita*. Las figuras A y B son fotografías de cortes de hembras extraídas de la población de estudio, C y D son los esquemas de comparación de la huella perineal de *M. incognita*.

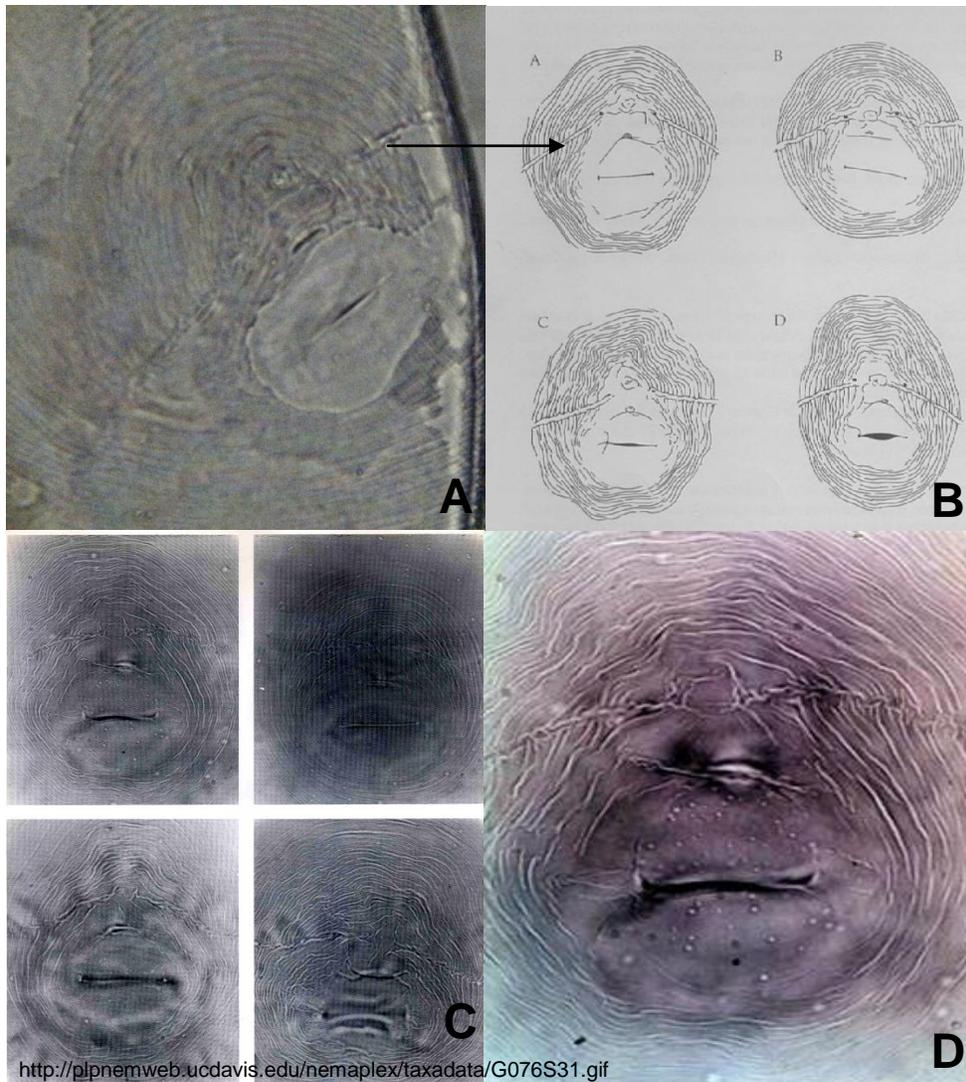


Figura 2. Cortes perineales de hembras de *Meloidogyne javanica*. A y B se observa la presencia del surco transversal en el corte perineal de una hembra de la población y el esquema. C y D son fotografías online de cortes de *M. javanica*.

7.2. Establecimiento del mejor medio de cultivo para la realización de las pruebas de patogenicidad.

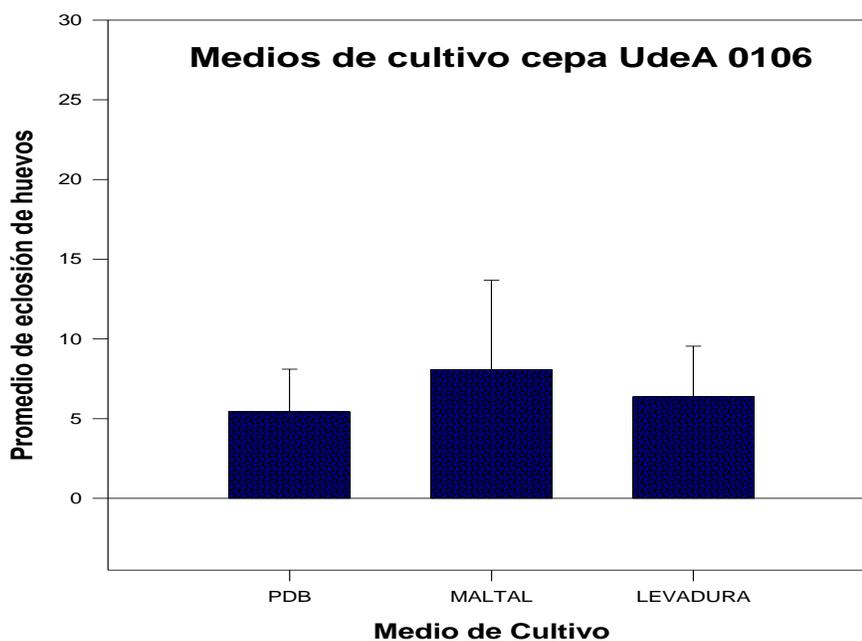
Dentro de los medios evaluados, el caldo Czapek Dox no se observó ningún crecimiento de la cepa por lo que fue descartado para la evaluación. De acuerdo con los resultados, se encontraron diferencias significativas en la eclosión de huevos en el medio extracto de malta ($p < 0,05$) con respecto a PDB y Caldo

extracto de Levadura; los cuales no difirieron significativamente ($p > 0,05$) entre si (tabla 3). Sin embargo, se seleccionó el medio caldo papa-destroxa para cultivo de la cepa *UdeA0106* debido a que obtuvo el menor promedio de eclosión de larvas y adicionalmente por su bajo costo (gráfica 1).

Tabla 3. Anova con los promedios de eclosión entre los diferentes medios de cultivo para la cepa *UdeA0106*.

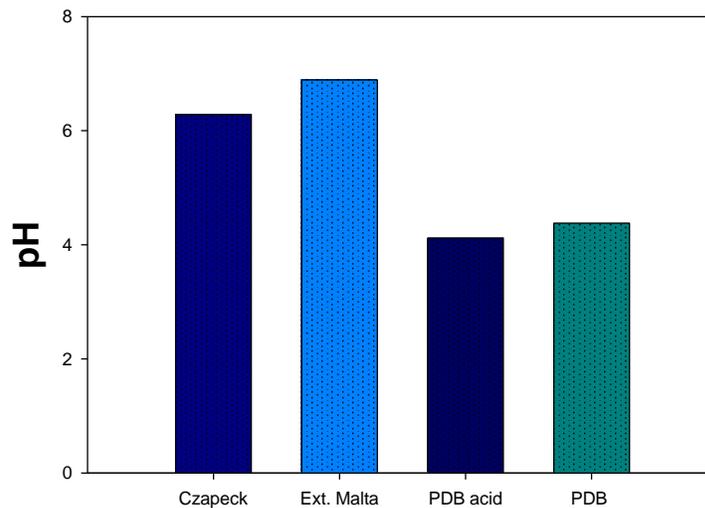
Medios de cultivo	Media	Desviación estándar	Error estándar	valor p
Extracto Malta	2,039 ^a	0,574	0,0956	0,002
Extracto Levadura	1,73 ^b	0,511	0,0826	
PDB	1,602 ^b	0,516	0.0807	

De acuerdo con el test de Tukey , los valores con letras iguales no presentaron diferencias en los diferentes medios evaluados



Grafica 1. Promedio de eclosión de huevos de *M. incognita-javanica* en los medios de cultivo PDB, Extracto de Malta y Extracto de Levadura

Medios de cultivo cepa UdeA 0106



Grafica 2. Valores de pH para los diferentes medios de cultivo de la cepa UdeA0106

7.3. Efecto antagonista del filtrado de la cepa *UdeA0106* sobre los huevos de *Meloidogyne incognita-javanica*.

En los distintos tiempos de lectura, los tratamientos con el filtrado de la cepa *UdeA0106* y los controles con ADE y medio PDB estéril, mostraron diferencias en la eclosión de los huevos de *M. incognita-javanica* (tabla 4). Así mismo, se demostraron diferencias en la interacción tiempo x dilución, evidenciando como el efecto sobre la eclosión de los huevos, depende del tiempo de exposición y la concentración del filtrado.

El porcentaje de eclosión de huevos a los dos días de exposición al filtrado de la cepa *UdeA0106*, fue del 3% y hubo diferencias significativas con el cuarto y sexto día de exposición donde aumento el porcentaje de eclosión a 10,5% y 9,6% respectivamente (grafica 3). Sin embargo, se logro mantener un porcentaje bajo en la eclosión de los huevos con los tratamientos al 100%, 90 y 70% durante todo el periodo de incubación del experimento.

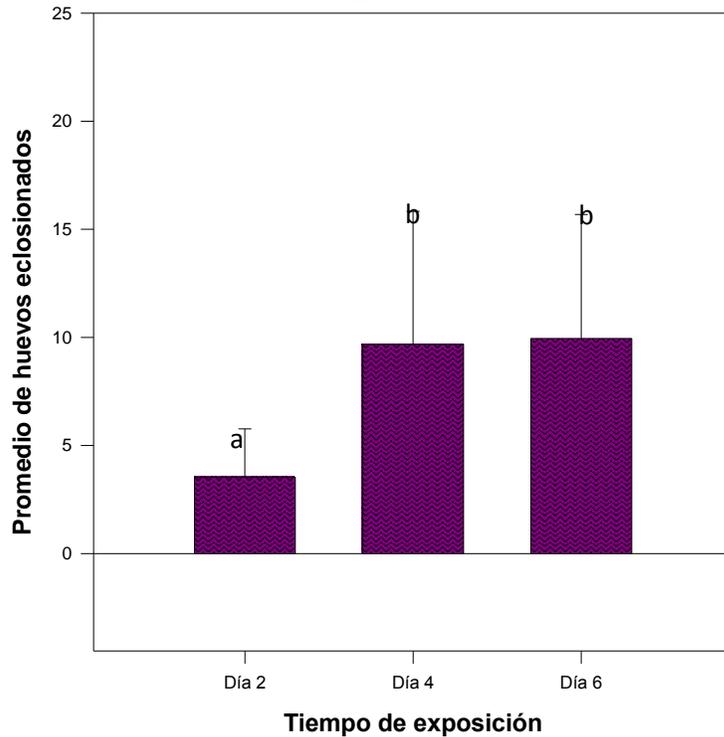
El tratamiento mas efectivo; que logro mantener el porcentaje más bajo de eclosión, fue el filtrado puro de la cepa *UdeA0106* al 100%, donde al cabo de los seis días de exposición, solo eclosionaron el 2% de los huevos del complejo *M.incognita-javanica*.

Del mismo modo, se encontró que los tratamientos con las diluciones del filtrado al 90% y 70%, obtuvieron porcentajes de eclosión de 3.4% y 6.4%. La dilución al 10% obtuvo un porcentaje de eclosión de 14.4% y no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) con los controles de ADE y PDB estéril, los cuales registraron una eclosión del 16,8% respectivamente (tabla 5). Lo anterior, indicaría que la cepa *UdeA0106*, esta produciendo ciertas sustancias que inhiben la eclosión de los huevos del complejo *M. incognita-javanica*, lo cual debe ser demostrado en posteriores estudios.

Tabla 4. ANOVA para determinar diferencias en los promedios de eclosión de los huevos *M. incognita-javanica* durante su periodo de exposición y en cada uno de los tratamientos.

Factor Efecto Intra-sujeto					
Origen	Suma de cuadrados tipo III	Gl	Media cuadrática	F	Valor p
Tiempo	42.973	2	21.487	172.631	<0.000
Tiempo * Dilución	6.838	14	0.488	3.924	<0.000
Error(Tiempo)	7.966	64	0.124		
Factor Efecto Inter-Sujeto					
Dilución	91.135	7	13.019	62.793	<0.000
Error(Dilución)	6.635	32	0.207		

Efecto del filtrado UdeA 0106 sobre huevos de *M. incognita-javanica*



Grafica 3. Promedio de huevos eclosionados con su desviación estandar. Las barras representan el promedio total de J2 que eclosionaron al segundo, cuarto y sexto día de incubación. Las letras indican diferencias significativas con la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

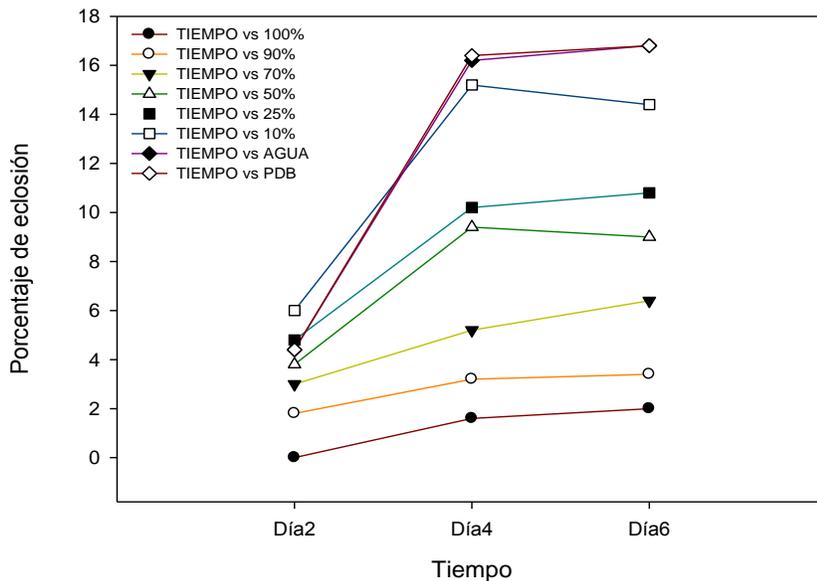
Tabla 5. Acción de diferentes concentraciones del filtrado de la cepa *UdeA0106* en la inhibición de la eclosión de huevos de *M. incognita-javanica*.

Dilución	Media	Subconjunto					
		1	2	3	4	5	6
100%	98 ± 1.00	2.00					
90%	96.6 ± 1.51	3.40	3.40				
70%	93.6 ± 1.14		6.40	6.40			
50%	91 ± 0.71			9.00	9.00		
25%	89.2 ± 0.83				10.80	10.80	
10%	85.6 ± 2.41					14.40	14.40
ADE	83.2 ± 3.27						16.80
PDB estéril	83.2 ± 2.49						16.80
Valor p		.934	.226	.391	.798	.083	.491

Test de Tukey con un nivel de confianza del 95%.

Es de resaltar que el comportamiento general de todos los tratamientos en el promedio de eclosión de los huevos tiende a ser asintótico después del cuarto día de exposición con el filtrado de la cepa *UdeA0106*, ya que no se encontraron diferencias significativas de los promedios en la eclosión de huevos de cada uno de los tratamientos entre el cuarto y sexto día (grafica 3 y 4).

Efecto del filtrado de la cepa *UdeA 0106* sobre la eclosión de huevos de *Meloidogyne incognita-javanica*



Grafica 4. Efecto del promedio de filtrado de la cepa *UdeA0106* sobre la eclosión de los huevos de *Meloidogyne incognita-javanica*. La grafica muestra que aunque hay un incremento en el numero de larvas, el tratamiento al 100% y las diluciones al 90% y al 70% lograron mantener un porcentaje de J2 muy bajo en comparacion con los controles.

Al momento de realizar las lecturas en el microscopio óptico invertido, de los ttos al 100%, 90% y 70% del filtrado de la cepa *UdeA0106*, se determinó que los J2 que lograron eclosionar, se encontraron muertos., aspecto que no fue observado en los demás tratamientos evaluados.

Por otra parte, aun cuando no se cuantifico el número de huevos embrionados anormales, se observó que para los tratamientos con el filtrado al 100%, 90%, 70% una gran proporción presentaban huevos vacuolados y con deterioro de la pared (Figura 3).

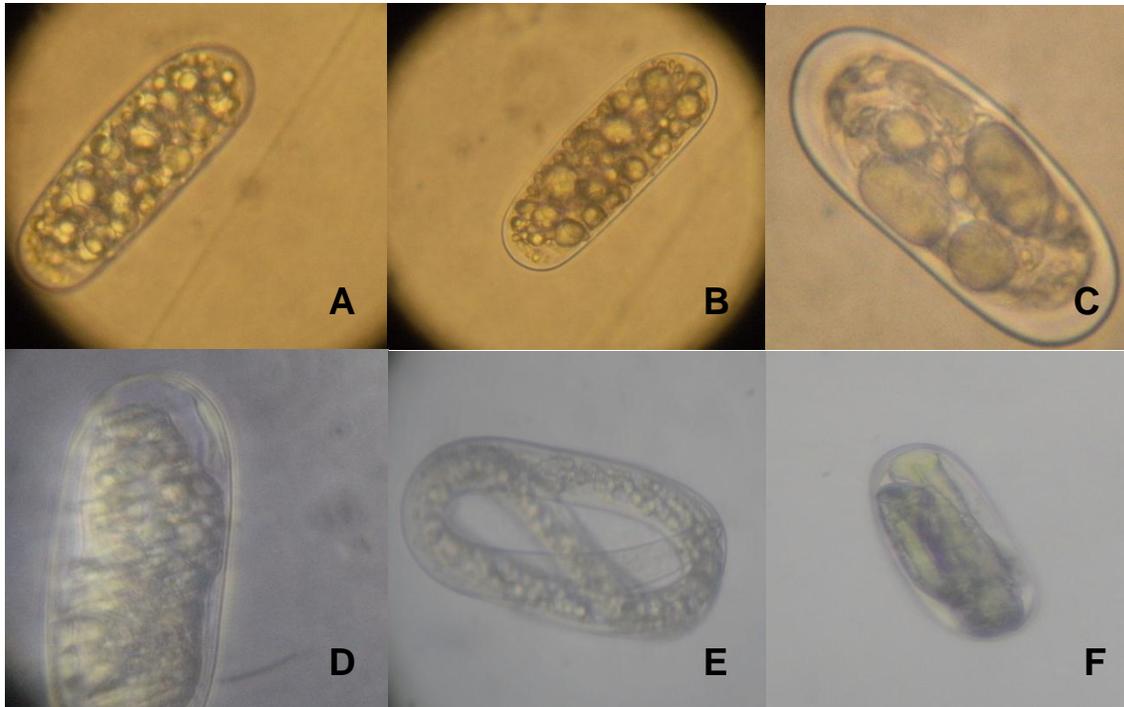


Figura 3. Huevos deformados por el filtrado de la cepa *UdeA0106*. Las imágenes A, B, C muestran huevos con formación de vacuolas a su interior, D huevos con deterioramiento de la pared, por último, E y F huevos embrionados con desarrollo normal de larvas de *Meloidogyne incognita-javanica*.

7.4. Efecto antagonista del filtrado de la cepa *UdeA0106* sobre los estadios J2 de *Meloidogyne incognita-javanica*.

La mortalidad de los estadios J2 de *M. incognita-javanica* mostró diferencias significativas para los tiempos de evaluación. De igual manera, se observó un efecto de los tratamientos en la interacción tiempo x dilución (Tabla 6). Sin embargo, el modelo estadístico no detectó claramente diferencias significativas del

efecto de la interacción del tiempo de exposición y la dilución del filtrado sobre la mortalidad de las larvas ($p= 0.043$).

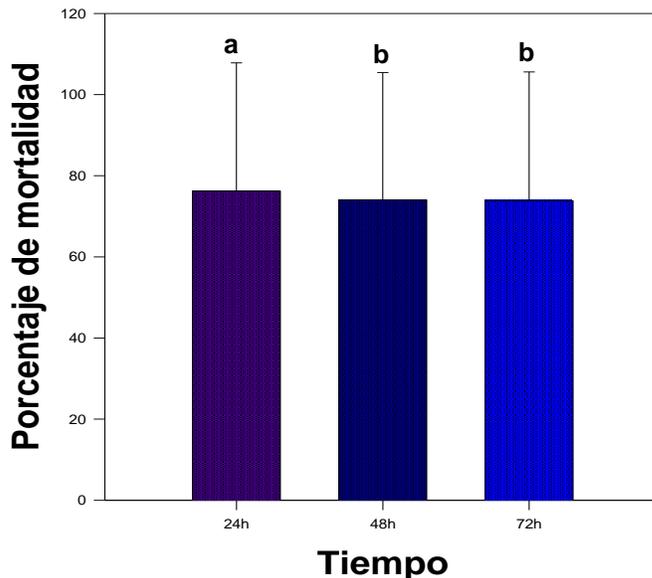
La mortalidad de los J2 a las 24 horas de exposición a los tratamientos del filtrado de la cepa *UdeA0106* fue mayor con un porcentaje de 76.3%, en comparación con los porcentaje registrados a las 48 y 72 horas de 74.05% y 73.8% respectivamente. La prueba de comparación de medias, estableció que no hubo diferencias en la mortalidad de las larvas, en estas dos últimas lecturas (grafica 5).

La diferencia entre los porcentajes de mortalidad de las tres lecturas, se debe principalmente al comportamiento de los tratamientos, ya que del mismo que se observó en la prueba de antagonismo con huevos de *M. incognita-javanica* presenta un comportamiento asintótico, es decir después de las 48 horas de exposición de los J2 al filtrado de la cepa *UdeA0106* se llega a una estabilización donde el porcentaje de mortalidad no aumenta significativamente

Tabla 6. ANOVA para determinar diferencias significativas en los promedios de mortalidad de J2 de *M. incognita-javanica* durante su periodo de exposición y en cada uno de los tratamientos.

Factor Tiempo					
Origen	Suma de cuadrados tipo III	GI	Media cuadrática	F	Valor p
Tiempo	0.15	2	0.007	12.154	<0.000
Tiempo * Dilución	0.13	10	0.001	2.1	0.043
Error(Tiempo)	0.029	48	0.001		
Factor Dilución					
Dilución	1.14	5	0.228	136.932	<0.000
Error(Dilución)	0.04	24	0.002		

Mortalidad de J2 de *M. incognita-javanica*



Grafica 5. Mortalidad de J2 de *M. incognita-javanica* durante el periodo de incubación con los tratamientos del filtrado de la cepa *UdeA0106*. No se tubo en cuenta el control de ADE para estos valores de medias. Letras diferentes indican diferencias significativas detectadas por la T de tukey ($p < 0.05$).

Al final del experimento; es decir a las 72 horas de incubación, se logro mantener un alta mortalidad de los estadios J2 en comparación con el control de ADE. Los tratamientos mas efectivos fueron el filtrado puro (100%) y las diluciones al 90% y 70% con porcentajes de mortalidad del 96,8%, 94.8% y 90.4% respectivamente, además se encontró diferencias significativas entre todos los tratamientos ($p < 0.05$). El control con ADE registro 0% de mortalidad en los estadios J2 de *M. incognita-javanica* a las 72 horas (tabla 7).

Tabla 7. Acción del filtrado de la cepa *UdeA0106* sobre los estadios J2 del complejo *M. incognita-javanica*.

Tratamiento	Porcentaje de J2 muertos 24h	Porcentaje de J2 muertos 48h	Porcentaje de J2 muertos 72h
100%	100±0	95.2±3.5	96.8±2.0
90%	98±2.1	93.6±2.6	94.8±2.7
70%	92.4±2.6	91.2±1.6	90.4±1.5
50%	88±1.3	88.4±2.3	88.4±2.3
25%	78.8±2.4	78±2.2	77.2±2.0
10%	74.4±4.2	70.8±2.0	68.4±1.5
ADE	3.2±2.0	0±0	0±0

Porcentaje de mortalidad de J2 para cada uno de los tratamientos en las tres lecturas

8. DISCUSIÓN

Se logró determinar que las especies que conformaban la población de estudio, eran *Meloidogyne incognita* y *Meloidogyne javanica*; muy posiblemente esto se deba a que estas especies se han reportado con mayor incidencia en países tropicales y en gran variedad de cultivos, en comparación con especies como *Meloidogyne hapla*, que se encuentra restringida a zonas mas templadas. Adicionalmente, estudios realizados para determinar un hospedero preferencial por parte de estas especies, se ha encontrado que ambas parasitan tomate (Taylor & Sasser, 1983).

La actividad de filtrados de hongos nematófagos contra especies de nematodos fitoparásitos ha sido reportada anteriormente (Cayrol *et al*, 1989., Siddiqui & Mahmood, 1996., Mayer *et al*, 1999., Kerry 2000) y los compuestos derivados de estos hongos con propiedades toxicas y/o enzimáticas, han sido una fuente

promisoria de nuevas sustancias para el manejo de nematodos parásitos de plantas (Nitao *et al.* 1999., citado en Regaieg *et al.* 2010).

Efectos adversos de los filtrados de hongos sobre la eclosión de huevos y la mortalidad de nemátodos parásitos de plantas han sido reportados por varios estudios (Cayrol, 1987., Mukhtar & Pervaz, 2003, Regaieg *et al.*, 2010., Yang *etal.*, 2010., Ayatollahy & Fatemy, 2010). Algunos hongos como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Talaromyces*, *Curvularia*, *Beauveria*, *Verticillium* entre otros se ha encontrado que producen toxinas y antibióticos como: aflotoxinas, Penicilina, Vermiculina, Vermicilina, ácido fusarico entre otros que aun no han sido identificadas (Al abed, 2008., Liu *et al.* 2008., Ayatollahy & Fatemy, 2010).

Estudios como el de Cayrol *et al.*, (1989) demostraron que la producción de compuestos con actividad toxica por parte de hongos nematófagos esta influenciado por el medio de cultivo en donde se propague, y esto concuerda con lo encontrado con la cepa *UdeA0106*, en donde los medios de cultivo como Extracto de Levadura y Extracto de Malta no lograron tener una inhibición considerable sobre el porcentaje de eclosión de J2 en comparación con el medio PDB que mostro una mayor disminución en el promedio de larvas que eclosionaban. Además, existen otros estudios de filtrados de hongos en donde se ha encontrado mayor inhibición en el porcentaje de eclosión de huevos de nematodos a partir de medios sumergidos en PDB qué con otros medios (Meyer *et al.* 2004., Shinya *et al.* 2008).

Por otra parte, se registraron los valores de pH para los diferentes medios en los que se cultivo la cepa *UdeA0106*, sin embargo, varios estudios han reportado que la producción de compuestos toxicos por parte del hongo no es afectada por los valores del pH (Cayrol *et al.*, 1989) sino por las condiciones del medio y el tipo de aislado (Meyer *et al.*, 2004).

Los resultados obtenidos con la cepa *UdeA0106*, indican que la eclosión de larvas fue inversamente proporcional a la dilución del filtrado y directamente proporcional al tiempo de exposición. Los tratamientos con mejor desempeño, fueron el filtrado

puro (100%) y la dilución al 90%, seguido de la dilución al 70% que de acuerdo con la prueba de Tukey, no arroja diferencias significativas con la dilución al 50%. Sin embargo, logro mantener un porcentaje de eclosión de huevos de *M. incognita-javanica* bajo en comparación con los otros tratamientos.

En la evaluación del tiempo de exposición, se encontró un aumento en la eclosión de huevos en el cuarto y sexto día, en comparación con el promedio de J2 eclosionaron al segundo día de exposición al filtrado, esto es debido a que la inhibición de la eclosión de los huevos fue proporcional a la dilución del filtrado, siendo mayor la inhibición en los tratamientos menos diluidos; mientras que en los tratamientos mas diluidos la eclosión no tubo diferencias significativas con los controles de PDB estéril y ADE. Del mismo modo fue el comportamiento del filtrado en la mortalidad de los J2. Estos resultados son similares a lo reportado para el efecto del filtrado de *Verticillium chlamydosporium* (*Metacordyceps chlamydosporia*) sobre huevos y J2 de *Meloidogyne javanica* en donde las diferentes diluciones del filtrado inhibieron la eclosión de los J2 (Mukhtar & Pervaz, 2003). Sin embargo, cabe mencionar que con concentraciones tan altas como las que se requieren para obtener una disminución considerable de la población de nematodos, es difícil de observar en la naturaleza por lo que son muy desfavorables, ya que no es sustentable el uso directo del filtrado en campo (Regaieg *et al.* 2010).

Los trabajos con hongos nematófagos cultivados en medios enriquecidos artificiales para producir compuestos naturales altamente toxicos a J2 de *M. incognita* han sido bien documentados (Hallmann & Sikora, 1996., Sikora *et al.* 2008., Perry *et al.* 2010) y para este estudio, la posibilidad de que haya sustancias con propiedades toxicas o enzimáticas en el filtrado del cultivo de la cepa *UdeA0106* que estén afectando la eclosión y el desarrollo de los huevos, y a su vez la mortalidad de los J2 de *M. incognita-javanica* se fundamentan en los resultados obtenidos por esta investigación.

Las diluciones del filtrado de la cepa *UdeA0106* al 50%, 25% no exhibieron una fuerte característica nematicida, lo cual puede ser debido a las condiciones del

ensayo; como el bajo número de replicas, o por el contrario, por el aislado en si mismo, ya que Meyer *et al*, (2004) reporta como puede variar la actividad de dos aislados de una misma especie de hongo contra una especie de nematodo fitoparásitos, y cita como dos cepas diferentes de *Paecilomyces lilacinus* inhibieron la eclosión de huevos *H. glycines*, siendo más activa una que la otra (Sun *et al*, 2002., citado en Meyer *et al*, 2004).

Adicionalmente, la acción del filtrado de la cepa *UdeA0106* sobre los estadios larvales J2 de *M. incognita-javanica*, también muestran un efecto nemato-toxico, ya que como los resultados indican se logro obtener una mortalidad del 96.8% con la dilución al 100% después de la 72h de exposición, al igual que las diluciones al 90% y 70% que obtuvieron una mortalidad por encima del 90%, difiriendo significativamente de la dilución al 10% que obtuvo una mortalidad del 68.4% y el control de ADE del 0%. Los anteriores resultados concuerda con lo reportado por otros filtrados de hongos que han mostrado estas características nemato-toxicas contra especies de nematodos fitoparásitos como los son *Paecylomices lilacinus*, *Trichordema harzianum*, *Baeuveria bassiana*, *Verticillium lecanii* (*Lecanicillium spp*), *Gymnoascus reessi*, *Verticillium chlamydosporium* (*Metacordyceps chlamisdosporia*) y *Verticillium leptobactrum* (Mukhtar & Pervaz, 2003, Shinya *et al*, 2008., Liu *et al*, 2008., Regaieg *et al* 2010., Liu *et al*. 2009., Liu *et al*, 2011, Yang *et al*, 2010).

Por otra parte, compuestos del filtrado de la cepa *UdeA0106* que pudieron tener un efecto sobre la inhibición en el porcentaje de eclosión, la malformación de los huevos y en la mortalidad de los estadios J2 de *Meloidogyne incognita-javanica* no se determinan para este estudio, pero existen investigaciones que sugieren mecanismos y enzimas extracelulares que juegan un rol importante en los procesos de patogenicidad de este grupo de hongos nematófagos. Bonas *et al*. 1995 reporto el efecto deletéreo del filtrado de un cultivo de *Paecilomyces lilacinus* sobre huevos de *Meloidogyne hapla*, sugiriendo que la causa de este efecto se debe a una proteasa extracelular que actúa sobre huevos, sin embargo, no afectó a los J2 eclosionados. Este resultado, también fue encontrado por el efecto del

filtrado de *Verticillium lecanii* (*Lecanicillium* spp) sobre huevos de *Heterodera glycines* (Shinya *et al.* 2008).

Posiblemente, el comportamiento de la cepa *UdeA0106* puede parecer similar a los reportados por otros hongos nematófagos, como por ejemplo *Pochonia chlamydosporia* o *Paecilomyces lilacinus* que han sido encontrados como hongos parásitos de huevos y productores de toxinas respectivamente contra nematodos fitoparásitos (Kiewnick & Sikora, 2006., Lopez-Llorca *et al*, 2008) y es posible que esta cepa, este produciendo enzimas hidrolíticas extracelulares; como quitinasas y proteasas, que son desarrolladas en procesos complejos que conllevan a la penetración y degradación de la cutícula del nematodo hospedero y su digestión celular (Kerry, 2000).

Se ha descrito, que la forma en que afecta la producción de toxinas por parte de estos hongos nematófagos a nematodos fitoparásitos ocurre por diferentes vías. Cayrol *et al.* (1989) sugiere que algunas toxinas producidas por hongos poseen un mecanismo de acción sobre los receptores neurotrópicos de los nematodos. Adicionalmente, se ha identificado un número de hongos nematófagos que son conocidos por tener actividad proteolítica y quitinolítica que causa serias alteraciones a la estructura cuticular de los huevos, cambios en la permeabilidad de la pared del huevo o causar perforaciones en la cutícula lo cual permite el paso de metabolitos tóxicos al interior del nematodo y causar desordenes fisiológicos (Lopez-Llorca *et al*, 2008., Mukhtar & Pervaz, 2003). Lo cual eventualmente puede estar explicando la formación de vacuolas al interior de los huevos de *M. incognita-javanica*.

Recientemente, mediante técnicas moleculares se han identificado una serie de proteínas que están involucradas en el mecanismo de acción de hongos nematofagos. Algunos estudios han reportado una serin proteasa denomina P32, por ser una proteína involucrada en la infección de huevos de nematodos y que esta contenida en un material extracelular que es liberado durante la quimiotaxis de hongos nematofagos, que específicamente degrada las proteínas de la capa

externa de la membrana vitelina de los huevos (Lopez-Llorca *et al*, 2008., Morton *et al*, 2004., citado en Regaieg *et al*, 2010).

Cardona *et al*, (2008) reportó para la cepa Cenicafe 9501, la cual es morfológicamente idéntica a la cepa UdeA0106, tiene unos genes asociados a los procesos de patogenicidad con huevos de *Meloidogyne*, la secuencias de los genes mostraron la presencia de peptidasas, un receptor para un sitio de ubiquitinación, una hidroxilasa ubiquitina, una ubiquinona oxireductosa, una proteína involucrada en la degradación de la pared celular, así como también una serin proteasa.

Por lo anterior, aun cuando apenas se están adelantando estudios que permitan indagar en la genómica de la cepa *UdeA0106* y que se ha encontrado compatibilidad en ciertos caracteres moleculares con la cepa Cenicafe 9501 (Reporte interno Laboratorio Bioma), se puede inferir por los resultados obtenidos, que los compuestos nematotoxicos encontrados en el filtrado pueden estar asociados a la expresión de algunos genes reportados por Cardona *et al*. 2008..

Por ultimo, los resultados de este estudio soportan la hipótesis de que los hongo pueden contribuir a la regulación de las densidades poblacionales de nematodos fitoparásitos a través de mecanismos de parasitismo y predación, o indirectamente por la producción de compuestos biológicamente activos (Verdejo-Lucas *et al*, 2009) como los producidos por la cepa del hyphomycete *UdeA0106*.

9. CONCLUSIONES

- Se encontró que la población de nematodos para el estudio estaba representadas por las especies de *Meloidogyne incognita* y *Meloidogyne javanica* ambas especies tienen los mayores reportes de incidencia en cultivos de países del trópico.
- El tratamiento mas eficiente para disminuir el porcentaje de eclosión de huevos de *Meloidogyne* spp es el filtrado puro. Sin embargo, las diluciones al 90% y 70% mantienen porcentajes de eclosión de los huevos muy bajos.
- Se observo un efecto colateral del filtrado, provocando la formación de vacuolas al interior de los huevos, esto puede ser explicado posiblemente a que el hyphomycete *UdeA0106*, este produciendo compuestos que estén alterando la embriogénesis del huevo y por ende su viabilidad.
- Para las condiciones de cultivo, el caldo PDB fue el que obtuvo una mayor actividad antagonista sobre la eclosión de los huevos.
- Se logro obtener porcentajes de mortalidad de los estadios J2 mayores al 90% con los tratamientos del filtrado de la cepa *UdeA0106* al 100%, 90% y 70%. Adicionalmente, la mortalidad no vario significativamente con respecto al tiempo de exposición.
- Se deben seguir realizando estudios que busque indagar sobre el rol antagónico de la *UdeA0106* sobre nematodos fitoparásitos tanto *in vivo* como *in vitro* y que exploten todos sus

mecanismos de acción que permitan mas adelante obtener nuevas alternativas para la bioformulación de hongos nematófagos.

10. RECOMENDACIONES

- Es necesario confrontar los resultados obtenidos con experimentos en invernadero, que permitan determinar el comportamiento del filtrado bajo condiciones más similares a las características de campo.
- Se deben cuantificar la cantidad e identificar el tipo de compuestos que estén presentes en el filtrado del cultivo de la cepa *UdeA0106*.
- Es necesario evaluar el filtrado crudo de la cepa *UdeA0106*, aumentando la concentración y el numero de replicas por tratamiento, para posteriormente obtener CL_{50} que sean extrapolables a condiciones de campo.
- Se requiere mas investigaciones sobre el uso de filtrados crudo de hongos nematófagos, ya que se no se conoce como puede influenciar en la composición de la biota del suelo donde se esté usando.
- Se deben realizar pruebas de antagonismo del filtrado con otras sustancias utilizadas en el manejo de plagas de nematodos fitoparásitos, que permitan conocer la eficiencia del filtrado.

11. BIBLIOGRAFIA

- Akhtar, M., Malik, A.** 2000. Roles of organic soil amendments and soil organisms in the biological control of plant-parasitic nematodes: a review. *Bioresource Technoogy*. 74: 35–47.
- Al abed Al kader, M.** 2008. *In vitro* Studies on Nematode Interactions with their Antagonistic Fungi in the Rhizosphere of Various Plants. (Tesis Doctorado). Freiburg im Breisgau, Germany. Faculty of Forest and Environmental Sciences, Albert-Ludwigs-Universität. p 227.
- Ayatollahy, E., Fatemy, S.** 2010. *In vitro* assessment of pathogenicity and culture filtrates of fungi against *Heterodera schachtii*. *Applied Entomology and Phytopathology*. Vol. 77, No. 2.
- Burkett-Cadena, M., N. Kokalis-Burelle, et al.** 2008. Suppressiveness of root-knot nematodes mediated by rhizobacteria. *Biological Control* **47**(1): 55-59.
- Cardona, N., Leguizamon, J.** 1994. Aislamiento y Patogenicidad de hongos y bacterias al nematodo del nudo radical del café *Meloidogyne* spp. Goeldi. *Revista Fitopatología Colombiana*. **21**(1): 39-52.
- Cardona Bustos, N. L., Betancur Perez, J. F., Rivera Serna, L. F., Gaitan Bustamante, A.** 2008. Identification of pathogenic candidates genes in the interaction of the CENICAFE 9501 strain with the root knot nematode

Meloidogyne spp. *Revista Facultad Nacional de Agronomía. Medellín*, vol.61, no.2, p.4527-4541. ISSN 0304-2847.

Castagnone-Sereno, P. 2002. Genetic variability in parthenogenetic root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp., & their ability to overcome plant resistance genes. *Nematology* **4**: 605-608.

Caillaud, M.C., Dubreuil, G., Quentin, M., Perfus-Barbeoch, L., Lecomte, P., Engler, J., Abad, P., Rosso, M.N., Favery, B. 2007. Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. *Journal of Plant Physiology*. 165: 104 – 113.

Cayrol, J. C., Djian, C., Pijarowski, L. 1989. Study of nematocidal properties of the culture filtrate of the nematophagous fungus *Paecilomyces lilacinus*. *Revue Nématol.* **12 (4)**: 331-336.

Chitwood D.J., 2002. Phytochemical based strategies for nematode control. *Annual Review of Phytopathology*. 40, 221-249.

Coyne, D.L., Nicol, J.M. and Claudius-Cole, B. 2007. Practical plant nematology: a field and laboratory guide. SP-IPM Secretariat, International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Cotonou, Benin.

Eisenback, Jonathan D. and Hunt, David J. 2009. General Morphology. Pp. 18-54, in Root-knot nematodes, Roland N. Perry, Maurice Moens, and James L. Starr, eds. CABI Wallingford, UK.

Fargette, M., Berthier, K. Richaud, M., Lollier, V., Franck, P., Hernandez, A., Frutos, R. 2009. Crosses prior to parthenogenesis explain the current genetic diversity of tropical plant-parasitic *Meloidogyne* species (Nematoda: Tylenchida). *Infection, Genetics and Evolution*. doi:10.1016/j.meegid.2009.04.013

Giraldo, M. A., Leguizamon, J., Chaves, B. 1997. Evaluacion de *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson para el control de *Meloidogyne* spp. Goeldi. en almacigos de café (*Coffea arabica* L.) variedad caturra. *Revista de Fitopatología Colombiana*. 21(2): 104-117.

Hashem, M., Abo-Elyousr, K. (2011) Management of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on tomato with combinations of different biocontrol organisms. *Crop Protection*. 30: 285-292.

- Kerry, B. R.** 2000. Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology* 38:423–441.
- Kaşkavalci, G., Tüzel, Y., Dura, O., Öztekin, G.B.** 2009. Effects of alternative control methods against *Meloidogyne incognita* in organic tomato production. *Ekoloji* 18:23 - 31
- Khan, Z., Park, S.D., Shin, S.Y., Bae, S.G., Yeon, I.K., Seo, Y.J.,** 2005. Management of *Meloidogyne incognita* on tomato by root-dip treatment in culture filtrate of the blue-green alga, *Microcoleus vaginatus*. *Bioresource Technology*. 96: 1338 - 1341.
- Kiewnick, S. & R. A. Sikora.** 2005. "Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* strain 251." *Biological Control* 38(2): 179-187.
- Kiewnick, S. & R. A. Sikora.** 2006. "Evaluation of *Paecilomyces lilacinus* strain 251 for the biological control of the northern root-knot nematode *Meloidogyne hapla* Chitwood." *Nematology*. 8: 69-78.
- Leguizamon, J. E.** 1994. Efecto de *Meloidogyne* spp. en plantaciones establecidas de café var. Caturra. In: Informe annual de actividades, disciplina Fitopatología, Chinchiná (Colombia), CENICAFE.
- Lopez-Llorca LV, Macia´-Vicente JG, Jansson H-B.** 2008. Mode of action and interactions of nematophagous fungi. In: Ciancio A, Mukerji KG (eds) Integrated management and biocontrol of vegetable and grain crops nematodes. *Springer*, NL, pp 49–74.
- Liu, T., Wang, L., Duan, Y. X., Wuang, X.** 2008. Nematicidal activity of culture filtrate of *Beauveria bassiana* againsts *Meloidogyne hapla*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24: 113-118.
- Liu, Y. J., Zhai, C. Y., Liu, Y., Zhang, K. Q.** 2009. Nematicidal Activity of *Paecilomyces* spp. and isolation a Novel Active Compound. *The Journal of Microbiology*. 47 (3): 248 - 252.

- Liu, J. H., Wang, L., Qiu, J. Y., Jiang, L. L., Jan, J. Y., Liu, T., Liu, W.C., Duan, Y. X.** 2011. Nematicidal activity of *Gymnoascus reesii* against *Meloidogyne incognita*. *African Journal of Microbiology Research*. 5 (18): 2715 - 2719.
- Mayer, A., Kilian, M., Hoster, B., Sterner, O. & Anke, H.** 1999. *In-vitro* and *in-vivo* nematicidal activities of the cyclic dodecapeptide omphalotin A. *Pesticide Science*. 55, 27-30.
- McSorley, R., K. H. Wang, et al.** 2008. "Suppression of root-knot nematodes in natural & agricultural soils." *Applied Soil Ecology*. 39(3): 291-298.
- Meyer, S.L.F., Massoud, S.I., Chitwood, D.J. & Roberts, D.P.** 2000. Evaluation of *Trichoderma virens* and *Burkholderia cepacia* for antagonistic activity against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Nematology*. 2: 871-879.
- Meyer S.L.F., Huettel R.N., Liu X.Z., Humber R.A., Juba J., Nitao J.K.** 2004. Activity of fungal culture filtrates against soybean cyst nematode and root-knot nematode egg hatch and juvenile motility. *Nematology*. 6: 23-32.
- Mukhtar, T. & Pervaz, I.** 2003. *In Vitro* Evaluation of Ovicidal and Larvicidal Effects of Culture Filtrate of *Verticillium chlamydosporium* Against *Meloidogyne javanica*. *International Journal of Agriculture & Biology*. 5 (4): 576-579
- Nico, A. I., Jimenez-Diaz, R.M., Castillo, P.** 2004. Control of root-knot nematodes by composted agro-industrial wastes in potting mixtures. *Crop Protection*. 23(7): 581–587.
- Oka, Y.** 2010. "Mechanisms of nematode suppression by organic soil amendments-A review." *Applied Soil Ecology* 44(2): 101-115.
- Perry, R.N., Moens, M., Starr, J.L.** 2010. Root-Knot Nematode. MPG Books group. UK.
- Piskiewicz, A. M., Duyts, H. van der Putten, W. H.** 2008. Multiple species-specific controls of root-feeding nematodes in natural soils. *Soil Biology & Biochemistry* 40(11): 2729-2735.

- Regaieg, H., Ciancio, A., Horrigue, N., Grasso, G., Rosso, L.** 2010. Effects of culture filtrates from the nematophagous fungus *Verticillium leptobactrum* on viability of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *World Journal Microbiology and Biotechnology*. DOI 10.1007/s11274-010-0397-4
- Sasser, J.N.** 1979. Economic importance of Meloidogyne in tropical countries. pp. 359-374 in: Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) systematics, biology and Control (Eds. F. Lamberti and C.E. Taylor). Academic Press, London.
- Sasser, J.N. and C.C. Carter.** 1985. Overview of the international *Meloidogyne* project, 1975-1984. : An Advanced Treatise on Meloidogyne. Vol. 1: Biology and Control, pp: 19-24 (Eds.): J. N. Sasser and C.C. Carter. North Carolina State.
- Sasser, J.N., Taylor, A.L.** 1983. Biología, Identificación y Control de los nematodos del nódulo de la raíz. (Especies de *Meloidogyne*). *Artes graficas de la Universidad de Carolina del Norte*. Carolina del norte. USA. 107pp
- Shinya, R., Aiuchi, D., Kushida, A., Tani, M., Kuramochi, K., Koike, M.** 2008. Effects of fungal culture filtrates of *Verticillium lecanii* (*Lecanicillium* spp.) hybrid strains on Heterodera glycines eggs and juveniles. *Journal of Invertebrate Pathology*. 97: 291-297.
- Siddiqui, Z., Mahmood, I.,** 1996. Biological control of plant parasitic nematodes by fungi: A Review. *Bioresource Technology* **58**: 229-239.
- Siddiqui, L.A., Oureshi, S.A., Sultana, V., Ehteshamul-Haque, S., Ghaffar, A.,** (2000). Biological control of root rot-knot disease complex of tomato. *Plant Soil*. 227: 163e169.
- Sikora, R.A.,** 1992. Managment of antagonistic potential in agricultural ecosystems fpr the biological control of plant parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology*. 30:245-70.
- Sikora, R.** 2005. Fusarium suppression of nematodes & diseases in horticultural crops & bananas. *Phytopathology*. 95(6): S138-S138.
- Sikora RA, Pocasangre L, Felde A, Niere B, Vu T. T, Dababat A. A.** 2008. Mutualistic endophytic fungi and in-planta suppressiveness to plant parasitic nematodes. *Biological Control*. 46:15–23

Trujillo, P. A., Hoyos et al. 2008. Determinacion de la DL₅₀ y TL₅₀ de extractos etanólicos de suspensiones celulares de *Azadirachta indica* sobre *Spodoptera frugiperda*. *Revista de Fitopatología Colombiana*. 61(2): 4564-4575.

Verdejo-Lucas, S., Viera, A., Stchigel, A.M, Sorribas, F.J. 2009. Screening culture filtrates of fungi for activity against *Tylenchulus semipenetrans* . *Biological Control*. 46:15 – 23.

Volcy, C. 1998. Nematodos diversidad y parasitismo .Tomo II .Medellín, Universidad Nacional de Colombia.182 Pág.

Williamson V.M., Hussey R.S. 1996. Nematode pathogenesis and resistance in plants. *Plant Cell*. 8, 1735–1745

Williamson, V.M. and C. Gleason, (2003). Plant nematode interactions. *Current Opinion in Plant Biology*. 6: 327-333.

Yang, Z. S., Li, G. H., Zhao, P. J., Zheng, X., Luo, S. L., Niu, X. M., Zhang, K. Q. 2010. Nematicidal activity of *Trichoderma spp.* and isolation of an active compound. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. DOI 10.1007/s11274-010-0410-y

Yeates, G.W., Bongers, T. 1999. Nematode diversity in agroecosystem. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 74: 113–135

Recurso bibliografico online.

Numbers of Living Species in Australia and the World (Internet). Australian Government. Fecha de acceso: 28 de Julio 2012. <<http://www.environment.gov.au/biodiversity/abrs/publications/other/species-numbers/2009/04-02-groups-invertebrates.html#nematoda>>