

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO



LA TENIA DE NEMATODOS: EL HONGO PARÁSITO *Spirogyromyces vermicola* EN POBLACIONES DE *Rhabditis* (Nematoda) Y *Caenorhabditis elegans*

Tesis

Que presenta MARTHA SANTIS SANTIS
Como requisito parcial para obtener el Grado de:
MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

Saltillo, Coahuila

Julio, 2016

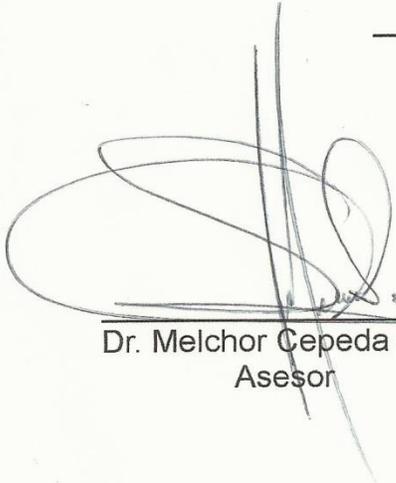
LA TENIA DE NEMATODOS: EL HONGO PARÁSITO *Spirogyromyces*
vermicola EN POBLACIONES DE *Rhabditis* (Nematoda) Y *Caenorhabditis*
elegans

Tesis

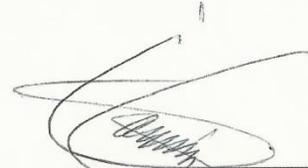
Elaborada por MARTHA SANTIS SANTIS como requisito parcial para
Obtener el grado de Maestro en Ciencias en Parasitología Agrícola con la
supervisión y aprobación del Comité de Asesoría



Dr. Sergio René Sánchez Peña
Asesor principal



Dr. Melchor Cepeda Siller
Asesor



Dr. Oswaldo García Martínez
Asesor



Dr. Alberto Sandoval Rangel
Subdirector de Posgrado
UAAAN

Agradecimientos

A DIOS:

Por haberme permitido terminar.

Al Centro Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la Beca otorgada durante el periodo de la Maestría.

A MI ALMA MATER

Por darme la oportunidad de terminar la maestría, de quien siempre estaré orgullosa y agradecida por haberme dado las herramientas necesarias para enfrentar los retos en mi vida.

Al Dr. Sergio René Sánchez Peña, por transmitirme sus conocimientos y todo el apoyo brindado durante la maestría.

Al Dr. Melchor Cepeda Siller, por la atención brindada y la revisión del presente escrito.

Al Dr. Oswaldo García Martínez, por su paciencia y su colaboración en la revisión de la tesis.

Dra. Rosa Estela Navarro González de la UNAM, por proporcionar las cepas de *Caenorhabditis elegans* y *Escherichia coli* OP50.

¡GRACIAS!

Dedicatoria

A MIS PADRES

Julieta Santis Méndez: Por ser una gran mujer a quien admiro mucho y de la cual me siento muy orgullosa, que siempre ha estado conmigo en las buenas y en las malas, agradezco sus consejos, sus regaños y sus abrazos, por eso y mucho más te quiero mamá.

Rodolfo Santis Méndez: Como no admirarlo, siempre tan fuerte y demostrando que lo imposible solo requiere un poco más de esfuerzo y paciencia. Agradezco sus consejos porque gracias a ellos he aprendido hacer mejor cada día y a cumplir muchas de mis metas por lo que agradezco a la vida de tener a papá |como él.

A MIS HERMANOS: Mis queridos hermanitos Rodolfo y Carolina, a los que quiero mucho, a los dos agradezco su paciencia, sus consejos, sus regaños, pero sobre todo agradezco el haberme brindado su tiempo compartiendo grandes travesías y hazañas hermosas de la infancia y si tuviera que elegir a mis hermanos los elegiría a ellos porque para mí son perfectos.

A MI HIJA: Mi princesita hermosa Karlita que cada día que pasa la quiero más, que con su sonrisa y travesuras me enseña que la vida puede ser hermosa si nos lo proponemos.

A MI ESPOSO: Moisés Felipe que lo quiero mucho, que agradezco su paciencia, pero sobretodo agradezco el cariño brindado.

A MIS AMIGOS: Jorge Camposeco y Artemio González, quienes siempre han estado conmigo.

¡GRACIAS!

Índice General

Índice General	iii
Lista de Cuadros.....	v
Lista de Figuras	vi
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT.....	x
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN DE LITERATURA	3
Daños Causados por Nematodos.....	3
Parasitismo de los Nematodos	3
Endoparásitos migratorios.....	3
Endoparásitos sedentarios	4
Nematodos ectoparásitos.....	5
Síntomas	6
Síntomas aéreos	6
Síntomas subterráneos	6
Agallas o nódulos en las raíces.....	7
Quistes o “raíz perlada”	7
Tipos de hongos nematófagos	9
Hongos ovicidas	9
Hongos depredadores.....	11
Hongos endoparásitos	12
Descripción <i>Spirogyromyces vermicola</i>	14
MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
Cultivo de <i>Tenebrio molitor</i> (Linnaeus) (Coleoptera: Tenebrionidae)	16
Cultivos de Nematodos Bacteriófagos.....	17

<i>Rhabditis sp.</i>	17
<i>Caenorhabditis elegans</i>	18
Aislamiento de Hongos Nematófagos.....	19
Aislamiento <i>Spirogyromyces vermicola</i>	20
Efecto de <i>Spirogyromyces vermicola</i> en <i>Rhabditis sp.</i>	21
Efecto de <i>Spirogyromyces vermicola</i> en <i>Caenorhabditis elegans</i> en Laboratorio	21
Análisis Estadístico.....	22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
Descripción de <i>Spirogyromyces vermicola</i>	23
Efecto de <i>Spirogyromyces vermicola</i> Sobre la Población de <i>Rhabditis sp.</i> en Laboratorio	26
Efecto de <i>Spirogyromyces vermicola</i> Sobre la Población de <i>Caenorhabditis elegans</i> , en Laboratorio	29
CONCLUSIONES	32
REFERENCIAS	33
Anexos.....	36

Lista de Cuadros

Cuadro 1 : Prueba de Levene, Grados de libertad y significancia en una prueba de t Student con varianzas homogéneas de la población de *Rhabditis sp.* con y sin inoculación de *Spirogyromyces vermicola*, arrojados por SPSS. 27

Cuadro 2: Prueba de Levene, grados de libertad y significancia en una prueba de t Student con varianzas homogéneas de la población de *Caenorhabditis elegans* con y sin inoculación de *S. vermicola* arrojados por SPSS. 29

Lista de Figuras

Figura 1: Nódulos producidos por <i>Meloidogyne incognita</i> en melón.....	7
Figura 2: Quistes de <i>Globodera rostochiensis</i> (nematodo dorado de la papa) .	8
Figura 3: Rama y conidia liberada en el medio de <i>Spirogyromyces vermicola</i>	15
Figura 4: Crecimiento de <i>Spirogyromyces vermicola</i> sobre <i>Rhabditis sp.</i>	15
Figura 5: Cría de <i>Tenebrio molitor</i> en la cámara número siete de la UAAAN-Saltillo	16
Figura 6: Cultivo de <i>Spirogyromyces vermicola</i> sobre <i>Rhabditis sp.</i>	18
Figura 7: <i>Caenorhabditis elegans</i> mostrando sus dos bulbos (medio y basal).	19
Figura 8: Conidia septada de <i>Spirogyromyces vermicola</i> A) "perilla" apical con el extremo vacío de citoplasma (distal respecto al apego al conidióforo) B) "pico" de la conidia encargada de adherirse al intestino del huésped (40x).	23
Figura 9: A) Conidia de <i>S. vermicola</i> madura, B) Conidia a largada el cual se lleva a cabo dentro del nematodo y C) joven talo con la formación de ramas laterales (crecimiento secundario) (40x).	24
Figura 10: Crecimiento de <i>Spirogyromyces vermicola</i> en <i>Rhabditis sp.</i> A) Esporas en el intestino del nematodo, B) Formación de ramas laterales cortas junto a los septos, C) Diferentes esporas en germinación en un mismo nematodo y D) <i>S. vermicola</i> ocupando el intestino del nematodo sin penetrar la faringe.....	25
Figura 11: Efecto de <i>Spirogyromyces vermicola</i> , sobre la población de <i>Rhabditis sp.</i> , en laboratorio.	27
Figura 12: Efecto de <i>Spirogyromyces vermicola</i> sobre la población de <i>C. elegans</i>	30

Figura 13: desarrollo de *Spirogyromyces vermicola* sobre *C. elegans* : A) Conidia joven en el intestino, B) conidia madura germinando, C) joven talo con una rama lateral, D) Y E) talos ampliamente ramificados, en el interior del intestino del huésped, E) llenado posterior de *S. vermicola* sin ocupar el esófago del huésped. 31

RESUMEN

LA TENIA DE NEMATODOS: EL HONGO PARÁSITO *Spirogyromyces vermicola* EN POBLACIONES DE *Rhabditis* (Nematoda) Y *Caenorhabditis elegans*

POR

MARTHA SANTIS SANTIS

MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DR. SERGIO RENÉ SÁNCHEZ PEÑA –ASESOR

SALTILLO, COAHUILA, JULIO 2016

Spirogyromyces vermicola es capaz de desarrollarse en *Rhabditis sp.* y liberar sus conidias maduras a través del ano de los nematodos al medio para perpetuar su especie. Se desconoce si puede penetrar e infectar a otras especies de nematodos y hasta qué punto puede afectar la población de *Rhabditis sp.*; por lo que el objetivo de este trabajo fue responder estas interrogantes.

Para el aislamiento de *S. vermicola* se empleó la metodología propuesta por Barron (1967). Se identificó el hongo a partir de muestras de suelo. Se tomaron cinco nematodos infectados, los cuales se colocaron en cajas de Petri con poblaciones de *Rhabditis sp.* no infectadas previamente establecidas. De esta manera se establecieron poblaciones de *Rhabditis sp.* infectadas con *S. vermicola*. Para evaluar si *S. vermicola* puede establecerse en *Caenorhabditis elegans*, se fragmentaron veinte nematodos infectados de *Rhabditis sp.* y se colocaron en cajas que contenían poblaciones de *C. elegans*. Para determinar el porcentaje de infección y efecto del hongo sobre poblaciones de *Rhabditis sp.*, se colocaron diez cajas de Petri con papel de estraza húmedo con diez nematodos infectados y diez no infectados; once días después de la inoculación se extrajo el papel y se colocó en frascos de vidrio con 20mL de agua, se agitó y prepararon montas de la suspensión para observar el porcentaje de infección; se contabilizó el total de la población. Se realizó el mismo procedimiento para *C. elegans* con la diferencia de que las observaciones se realizaron en medio PDAYH (Agar papa dextrosa, extracto de levadura y yema de huevo).

El efecto de *S. vermicola* en *Rhabditis sp.* y *C. elegans*, no fue estadísticamente significativo; en *Rhabditis sp.*, aun cuando redujo 21.2% la población, con una incidencia del 59%. Por otro lado si logra establecerse en *C. elegans* con una incidencia del 45% y una reducción en la población de 8.5%. Por tanto en estas observaciones, *S. vermicola* no afecta las poblaciones de nematodos aun cuando completa su ciclo de vida en el hospedero.

Palabras claves: *Spirogyromyces vermicola*, *Rhabditis sp.*, *Caenorhabditis elegans* y hospedero.

ABSTRACT

THE NEMATODE'S TAPEWORM: THE PARASITIC FUNGUS IN
POPULATIONS *Spirogyromyces vermicola* *Rhabditis* (Nematoda) AND
Caenorhabditis elegans

BY

MARTHA SANTIS SANTIS

MASTER IN SCIENCE IN AGRICULTURAL PARASITOLOGY

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DR. SERGIO RENÉ SÁNCHEZ PEÑA -ADVISER

SALTILLO, COAHUILA JULY 2016

Spirogyromyces vermicola is able to develop in *Rhabditis sp.* and release its mature conidia through the anus of nematodes as the means to perpetuate their species; it is unknown whether it can penetrate and infect another species of nematodes and to what extent it can affect the population of hosts; so the aim of this study was to answer these questions.

For isolation of *S. vermicola* we used the methodology of Barron (1967); two weeks after sampling, five infected nematodes were taken, and placed in Petri dishes with uninfected populations of *Rhabditis sp.* previously established, in order to establish infected populations of *Rhabditis*. To assess whether *S. vermicola* can infect another host, twenty infected *Rhabditis sp.* nematodes were fragmented and placed in petri dishes containing populations of *Caenorhabditis elegans*. To determine the percentage of infection and effect of the fungus on nematode populations, ten Petri dishes were set with wet brown bag paper and mealworms as nematode food. Ten infected and ten uninfected nematodes were placed in dishes. Eleven days after inoculation the paper was removed and placed in glass jars with 20 mL of water, stirred and the suspension was observed to determine the percentage of infection and total population. The same procedure was repeated for *C. elegans* with the difference that observations were made on PDAYH (potato dextrose agar, yeast extract and egg yolk).

The effect of *S. vermicola* in *Rhabditis sp.* and *C. elegans*, was not statistically significant even though in *Rhabditis sp.*, populations were reduced 21.2% with an incidence (infected individuals) of 59%. For *C. elegans*, there was an incidence of 45% and a reduction in population of 8.5%. *S. vermicola* did not affect nematode populations even though it completes its life cycle in hosts.

Key words: *Spirogyromyces vermicola*, *Rhabditis sp.*, *Caenorhabditis elegans* and host.

INTRODUCCIÓN

Se conocen diferentes antagonistas de nematodos entre ellos se incluyen hongos, bacterias, virus, plantas, protozoarios, turbelarios, tardígrados, ácaros e inclusive otros nematodos (Peraza *et al.*, 2011), los hongos nematófagos son los más importantes en la regulación de poblaciones de nematodos (Chen y Dickson, 2004), son habitantes del suelo que utilizan sus esporas o micelio para capturar nematodos vermiformes. Se les encuentra en diferentes tipos de sustratos y son capaces de sobrevivir en condiciones climáticas o nutricionales extremas en diferentes regiones geográficas del mundo (Gray *et al.*, 1982). En la actualidad, más de 200 especies de hongos nematófagos han sido descritas y son un grupo con alto potencial para ser usados como agentes de control biológico en la supresión de nematodos (Kerry, 2000).

En función del modo en que utilizan a los nematodos como recurso nutritivo, los hongos nematófagos se dividen en tres grupos: endoparásitos, ovidas y depredadores. Las hifas de los endoparásitos crecen únicamente dentro del nematodo, excepto las hifas fértiles que crecen en el exterior. Según la especie, las esporas pueden ser ingeridas para penetrar en el interior del nematodo y posteriormente germinar; las esporas se pueden adherir y perforar la cutícula del nematodo, o bien presentar zoosporas móviles, que parecen tener un tropismo positivo hacia los nematodos; los ovidas en su mayoría son saprófitos, por lo que no dependen de la presencia de huevos en el medio. La mayoría de los estudios se han enfocado en la colonización de quistes conteniendo huevos de nematodos fitopatógenos (Orozco *et al.*, 2009); por último, los hongos depredadores se caracterizan por producir un extenso sistema de hifas y a lo largo de las hifas a ciertos intervalos presentan estructuras especializadas para atrapar y sostener nematodos vivos. Estas estructuras pueden ser perillas pegajosas, anillos no adhesivos, redes adhesivas, anillos constrictores; con la ayuda de estas estructuras los hongos depredadores son capaces de atrapar y consumir los estadios larvarios de los nematodos presentes en el suelo (Barron, 1977).

Spirogyromyces vermicola habita en el intestino de *Rhabditis sp.*, las esporas son hialinas de 43-70 micrómetros de largo y 2-2.8 micrómetros de ancho, la cual se reduce ligeramente para formar un bulbo e ingeridas cuando los nematodos se alimentan de las bacterias; una vez dentro, estas se adhieren al intestino para evitar ser defecadas para nutrirse de los fluidos del intestino provocados por el bulbo y esófago. Las esporas o ramas generadas surgen cerca de los septos; una vez que el joven talo alcanza la madurez puede generar esporas que serán liberadas por el ano del nematodo (Tzean y Barron, 1981).

El planteamiento de inocular a *S. vermicola* en otra especie de nematodo, como lo es *Caenorhabditis elegans* es interesante, ya que se desconoce si puede penetrar e infectar a otra especie, debido a que Tzean y Barron (1981) solo lo observaron en *Rhabditis sp.*; aunque se conoce que *S. vermicola* se desarrolla en *Rhabditis sp.*, aun no se sabe cómo influye en la población.

Se sabe que *S. vermicola* se beneficia en esta relación interespecífica, pero aún no está claro que beneficios obtiene *Rhabditis sp.*, por ello la importancia de este trabajo para generar más información y responder a estas interrogantes; además de verificar si *S. vermicola* es realmente poco eficaz para el control de nematodos, por lo que los objetivos de este trabajo fueron describir a *S. vermicola*, evaluar si *S. vermicola* puede penetrar a *Caenorhabditis elegans* y evaluar el comportamiento y efecto del hongo en poblaciones de *Rhabditis sp.* y *Caenorhabditis elegans* en laboratorio.

REVISIÓN DE LITERATURA

Daños Causados por Nematodos

Se conocen 4,105 especies de nematodos fitoparásitos, que causan pérdidas anuales equivalentes a 80 billones de dólares en cultivos de importancia económica como palma de coco, leguminosas, granos, yuca, remolacha azucarera, caña de azúcar, hortalizas y varios frutales (Agrios, 2005).

Las infecciones causadas por nematodos fitoparásitos, pueden causar en la aparición de síntomas en raíces y tejidos aéreos de las plantas. Debido a que los síntomas en raíces están frecuentemente acompañados por síntomas no característicos en los tejidos aéreos de las plantas, es necesario examinar las raíces y otros tejidos de la planta para establecer una conexión entre los síntomas del daño y los fitonematodos (Guzmán *et al.*, 2012).

Parasitismo de los Nematodos

Los nematodos se pueden agrupar por sus hábitos y movilidad en dos grupos principales (Coyne *et al.*, 2007):

1. Endoparásitos: penetran el tejido vegetal (total o parcialmente). Se plantea que este grupo pasa al menos una etapa de su vida en el interior de los tejidos donde se alimenta y como consecuencia produce serias lesiones: nódulos, agallas, deformaciones entre otras (Escobar *et al.*, 1999). Su persistencia en los tejidos por largos períodos, supone el establecimiento de una relación huésped -patógeno muy compleja, razón por la cual se trabaja hoy intensamente. Los endoparásitos a su vez se dividen en migratorios y sedentarios (Herreros *et al.*, 2001).
2. Ectoparásitos: nematodos que se alimentan de la planta desde el exterior sin invadir la misma.

Endoparásitos migratorios

Todos los estadios del ciclo de vida de los nematodos endoparásitos son móviles, excepto el huevo. Los nematodos perforan el tejido vegetal

desplazándose de célula en célula, o pueden abandonarlo en busca de nuevos sitios de alimentación. Mientras se alimentan normalmente depositan los huevos dentro del tejido cortical de la planta y también en el suelo que rodea la raíz. Las células dañadas liberan toxinas que provocan la muerte de las células vecinas, dando lugar a pequeñas manchas o lesiones de tejido necrótico. Con frecuencia, los hongos que producen podredumbre de las raíces y las bacterias se encuentran asociados con las infestaciones de los nematodos migratorios y entran en los tejidos de la planta a través de las zonas dañadas por los nematodos (Coyne *et al.*, 2007). Existen endoparásitos migratorios de partes aéreas y subterráneas.

Endoparásitos sedentarios

Los endoparásitos sedentarios pueden ser divididos en dos grandes grupos: los nematodos formadores de quistes y formadores de nódulos o agallas en la raíz. Dentro de este último grupo se encuentran ubicados los Géneros *Meloidogyne* y *Heterodera* (Herreros *et al.*, 2001).

Los juveniles de segundo estadio de los nematodos endoparásitos sedentarios recién eclosionados de los huevos, son los que normalmente invaden el tejido de la planta y constituyen el estadio infectivo. Estos se mueven a través de las partículas de suelo para localizar las raíces de la planta huésped, y posteriormente, a través del tejido radical para encontrar un sitio de alimentación. En el sitio de alimentación se desarrolla la hembra, y allí permanece durante el resto de su ciclo de vida. Conforme la hembra se desarrolla, su cuerpo se hincha y adopta ya sea forma esférica, de limón, riñón, u ovoide. El nematodo se alimenta de un número reducido de células vegetales y este proceso está regulado por el nematodo mediante sustancias de crecimiento. Algunos grupos (por ejemplo los nematodos de los quistes y de las agallas) inducen en la planta huésped la formación de las llamadas “células alimenticias gigantes” (Coyne *et al.*, 2007).

Los machos se mantienen vermiformes durante todo el ciclo de vida, alimentándose en la superficie de la raíz unos días; durante este tiempo pueden

o no fecundar a las hembras antes de migrar al suelo donde mueren (Coyne *et al.*, 2007).

Las hembras de los nematodos endoparásitos sedentarios, generalmente producen gran cantidad de huevos, que permanecen dentro de su cuerpo, como en el caso de los nematodos de los quistes *Heterodera spp.*, o se acumulan en masas de huevos, las cuales permanecen unidas a sus cuerpos como los nematodos de las agallas *Meloidogyne spp.*; otros nematodos son sedentarios, pero solamente semiendoparásitos, como el nematodo reniforme *Rotylenchulus spp.* y el de los cítricos *Tylenchulus semipenetrans*, los cuales se encuentran embebidos parcialmente en el tejido radical (Coyne *et al.*, 2007).

Nematodos ectoparásitos

Atacan la parte exterior de los tejidos. Se alimentan introduciendo su estilete en los tejidos vegetales, pero cumplen todo o casi todo, su ciclo evolutivo en el exterior de la planta huésped (Sijmons, 1993).

Los nematodos ectoparásitos se alimentan sobre la superficie de la planta externamente, generalmente en los pelos radicales o tejidos corticales. Normalmente, se encuentran en grandes densidades poblacionales pero no siempre constituyen un problema. Pueden causar daño grave cuando la planta está sufriendo otros estreses bióticos o abióticos (por ejemplo ataques fúngicos o poca disponibilidad de agua). Ejemplos de ectoparásitos son los nematodos *Criconemoides spp.* (nematodos de anillo), *Helicotylenchus spp.* (nematodo de espiral) y *Aphelenchoides besseyi* (el nematodo aéreo que produce la punta blanca del arroz. Es bien sabido que algunos ectoparásitos actúan como vectores de virus de plantas, por ejemplo algunas especies de *Xiphinema spp.* (nematodo daga.), *Longidorus spp.* (nematodos aguja), *Trichodorus spp.* y *Paratrichodorus spp.* (especies de nematodos que causan atrofia) (Coyne *et al.*, 2007).

Síntomas

Síntomas aéreos

Estos síntomas son generalmente específicos y están asociados al nematodo que lo ocasiona, y por tanto, puede tener carácter diagnóstico. Estos incluyen:

- La formación de agallas o hinchamiento anormal de las semillas, ejemplo *Anguina sp.* o de las hojas, ejemplo *Cynipanguina sp.*
- Estrías y decoloraciones de las hojas, especialmente en climas templados, ejemplo: *Aphenchoides sp.*
- Hinchamiento, crecimiento arrugado o desorganizado de tejido, causado por *Ditylenchus sp.*
- Necrosis interna del tallo puesta de manifiesto por un anillo rojo, causada por *Bursaphelenchus cocophilus*.
- Necrosis de la inflorescencia.
- Clorosis o pardeado de las hojas (agujas de los pinos) y muerte eventual de los árboles, daños por *Busaphelenchus xylophylus* (Guzmán *et al.*, 2009).

Síntomas subterráneos

Estos se deben a los nematodos parásitos de las raíces, y pueden ser lo suficientemente específicos como para permitir el diagnóstico del nematodo. Para observar los síntomas es necesario arrancar o desenterrar las raíces de las plantas. Los síntomas incluyen:

- Agallado
- Raíces escasas, más cortas y engrosadas
- Lesiones en las raíces
- Necrosis en las raíces o tubérculos, podredumbre o muerte
- Agrietado de la raíces o tubérculos
- Quistes o raíz perlada
- Raíces deformadas
- Alteraciones de la arquitectura de la raíz

Agallas o nódulos en las raíces

Las agallas en las raíces, están causadas principalmente por *Meloidogyne spp.* (nematodo agallador), aunque otros nematodos como *Nacobbus aberrans* también puede causar agallado en las raíces. Algunos nematodos, como *Xiphinema spp.*, al alimentarse de las raíces pueden dar lugar a hinchamientos o agallas menos definidas que se localizan en las puntas de las raíces (Román y Acosta, 1984).

Las agallas pueden variar considerablemente, dependiendo de las especies de *Meloidogyne*, el cultivo, y si estas tienen lugar en las raíces ó en los tubérculos (Román y Acosta, 1984).



Figura 1: Nódulos producidos por *Meloidogyne incognita* en melón

Quistes o “raíz perlada”

Los nematodos formadores de quistes poseen estiletes robustos que les permiten perforar la pared celular. Los juveniles penetran la raíz en dirección al cilindro vascular, perpendicularmente a la superficie de la raíz. La migración hacia el cilindro vascular, es destructiva (intracelular) y los nematodos dejan un

rastros de células muertas en su recorrido. Cuando la endodermis es perforada y los nematodos penetran el cilindro vascular, la conducta destructiva cambia por una explorativa que finaliza con la identificación de las células parenquimatosas y la selección de las células precursoras del sitio de alimentación (Wyss y Zunke, 1986).

Los nematodos de los quistes *Heterodera spp.* y *Globodera spp.*, se pueden observar en la superficie de las raíces de las plantas huésped sin necesidad de aumento si se golpea la raíz suavemente para eliminar el suelo adherido a las mismas, o bien, si el observador mira con atención. Las hembras jóvenes se ven como diminutas cuentas o bolitas blancas, dando una apariencia perlada a la raíz cuando hay muchas hembras. Conforme las hembras maduran, el quiste, que puede contener cientos de huevos, se endurece y se vuelve marrón ó negro (Román y Acosta, 1984).



Figura 2: Quistes de *Globodera rostochiensis* (nematodo dorado de la papa)

Tipos de hongos nematófagos

Los antagonistas de los nematodos, han sido localizados en un amplio rango de organismos que incluyen hongos, bacterias, virus, plantas, protozoarios, turbelarios, tardígrados, ácaros e inclusive otros nematodos (Peraza *et al.*, 2011).

Los hongos nematófagos son habitantes del suelo que utilizan sus esporas o micelio para capturar nematodos vermiformes. Se les encuentra en diferentes tipos de sustratos y son capaces de sobrevivir en condiciones climáticas o nutricionales extremas en diferentes regiones geográficas del mundo (Gray *et al.*, 1982).

Orozco *at al.*, (2009), menciona que los hongos nematófagos son microorganismos que atrapan, destruyen y se alimentan de nematodos vivos en el suelo. Pertenecen en su mayoría al grupo de los Hyphomycetes (Deuteromycetes).

Sagüés *et al.*, (2011), coinciden en que la mayoría pertenecen a los denominados hongos imperfectos o Deuteromycetes. Existen más de 200 especies de hongos nematófagos descritas; Dichos hongos constituyen un grupo heterogéneo y ubicuo, viviendo normalmente en forma saprofítica y ocupando diferentes nichos en el suelo, donde también pueden alimentarse de una amplia gama de nematodos de vida libre, ya sea como recurso principal o secundario; en función del modo en que utilizan a los nematodos como recurso nutritivo, los hongos nematófagos se dividen en tres grupos: Ovicidas, depredadores y endoparásitos.

Hongos ovicidas

Sagüés *et al.*, (2011), señalan que los hongos ovicidas pueden ser usados para el control biológico de nematodos parásitos y especialmente nematodos fitopatógenos (patógenos de las plantas). En su mayoría son saprófitos, por lo que no dependen de la presencia de huevos en el medio. La mayoría de los

estudios se han enfocado en la colonización de quistes conteniendo huevos de nematodos fitopatógenos.

Lysek y Sterba (1991), propusieron dos mecanismos de acción de penetración del hongo en el huevo: a través de una simple penetración de la hifa vegetativa a través de la cáscara del huevo, o a través de la formación de un órgano específico de penetración (apresorio) en el sitio de contacto de la hifa con la cáscara (corion) del huevo.

Gaspard *et al.*, (1990) mencionan que *Paecilomyces lilacinus* (Espina) Samson y *Pochonia chlamydosporia* Goddard, han sido identificados como parásitos de huevo y se asocian con la supresión de nematodos formadores de nódulos de la raíz y nematodos formadores de quiste. Su potencial como agentes de control biológico es sugerido por estudios en los que las cantidades de nematodos disminuyen al inocular estos hongos.

El potencial de tres cepas *Pochonia chlamydosporia* Goddard como agentes de control biológico de *Meloidogyne arenaria* en plantas de tomate fue investigado bajo condiciones de invernadero. Las tres cepas sobrevivieron bien en el suelo, pero mostraron marcadas diferencias en su capacidad para colonizar las raíces no infectadas, agallas de nematodos y huevos de nematodos, obteniéndose una reducción significativa de la población de 80% después de la primera generación de nematodos (Frans *et al.*, 1991).

Carrión y Desgarenes en el 2012 inocularon un mililitro de suspensión de *Paecilomyces lilacinus* a una concentración de 1×10^6 en cada caja de Petri para exponer *in vitro* directamente a los nematodos de *Globodera rostochiensis* en J₂, reproducidas en agar avena; al cuarto día de la inoculación el 44.8% de los nematodos estaban muertos en comparación con el testigo que solo presentaba una mortalidad de 0.8%.

Puertas e Hidalgo (2009) aplicaron 5000 clamidosporas.g⁻¹ de suelo de *Pochonia chlamydosporia* obteniendo un parasitismo en huevos del 50% en *Meloidogyne incognita* esta aplicación se realizó al sustrato en el cultivo de tomate, permitiendo que el hongo colonizara las raíces.

Arévalo *et al.*, (2012), aplicaron *Pochonia chlamydosporia* en asociación tomate y lechuga, obteniendo un porcentaje de colonización sobre las masas de huevo de *Meloidogyne enterolobii* superior al 60% en todos los tratamientos, mientras que los porcentajes de parasitismo de huevos estuvieron entre 45 y 55%.

Dávila y Clímaco (2005), aplicaron bajo condiciones *in vitro* *Arthrobotrys* y *Paecilomyces* en dosis de 1.14×10^7 logrando el control de *Meloidogyne javanica* hasta de 50% sobre larvas y huevos; también aplicaron bajo condiciones de invernadero en plantas de crisantemo, logrando una media de siete y ocho nódulos de forma individual y 18 nódulos combinados evaluados 45 días después de la aplicación.

Hongos depredadores

Son hongos saprófitos que forman un sistema miceliar extensivo en el medio y emplean como recurso nutritivo las fases de vida libre de los nematodos. Algunos de los géneros más importantes dentro de este grupo son *Arthrobotrys*, *Dactylaria*, *Dactylella* y *Monacrosporium*.

Barron (1977), menciona que los hongos depredadores se caracterizan por producir un extenso sistema de hifas a lo largo de las hifas; a ciertos intervalos presentan estructuras especializadas para atrapar y sostener nematodos vivos. Estas estructuras pueden ser perillas pegajosas, anillos no adhesivos, redes adhesivas, anillos constrictores; con la ayuda de estas estructuras, los hongos depredadores son capaces de atrapar y consumir los estadios larvarios de los nematodos presentes en el suelo.

Un grupo abundante de hongos depredadores utiliza como estrategia de captura la formación de redes tridimensionales adhesivas. Toda la red está cubierta por una capa mucilaginosa a la que quedan adheridos los nematodos y cuya producción parece estar estimulada por el forcejeo de los nematodos atrapados. La forma de capturar de los hongos nematófagos es una combinación de fuerza mecánica (órganos de captura) y la liberación de enzimas hidrolíticas extracelulares, tales como proteasas séricas, quitinasas y colagenasas que digieren la cutícula del nematodo (compuesta principalmente

por proteínas). Una hora después de la penetración, el hongo forma un bulbo infectivo en el interior del nematodo y en pocas horas ocupa completamente el cuerpo de este. El proceso de digestión puede llegar a durar hasta una semana, tras lo cual la hifa trófica se degrada y el hongo se desarrolla de nuevo saprofiticamente, hasta que la presencia de nematodos en el medio estimula nuevamente su actividad predadora (Sagüés *et al.*, 2011).

Orozco *et al.*, (2009) señalan que en la actualidad el grupo de los hongos nematófagos depredadores es el que ha tenido mayor relevancia en la investigación sobre opciones de control biológico de nematodos.

Las agallas de raíz de arroz causada por *Meloidogyne graminicola* se examinaron para la colonización por hongos nematófagos de cuatro campos. Los hongos aplicados fueron: *Monacrosporium eudermatum*, *Arthrobotrys oligospora*, *Arthrobotrys dactyloides* y *Dactylaria brochopaga*. En pruebas in vitro de los cuatro hongos, mostraron que *A. dactyloides* fue más eficaz en la captura y matanza J₂ de *M. graminicola* seguido por *D. brochopaga* y *M. eudermatum*. La aplicación de inóculos de *A. dactyloides* y *D. brochopaga* en suelo infestado con *M. graminicola*, respectivamente, redujo el número de agallas de raíz en 86%, el de las hembras 94% y los huevos y juveniles 94% (Singh *et al.*, 2007).

La aplicación de *Dactylaria brochopaga* en *Meloidogyne graminicola* en J₂ ha logrado reducir hasta 51.28, 64.10, y 71,79% los nódulos en raíz, el número de hembras en 58.51% y el número de masas de huevo en 47.89% en plantas de trigo (Kumar y Singh; 2011), las cuales se encontraban en macetas.

Hongos endoparásitos

Orozco *et al.*, (2009) mencionan que en los endoparásitos sus hifas crecen únicamente dentro del nematodo, excepto las hifas fértiles que crecen en el exterior. Según la especie, las esporas pueden ser ingeridas para penetrar en el

interior del nematodo y posteriormente germinar; las esporas se pueden adherir y perforar la cutícula del nematodo, o presentar zoosporas móviles que parecen tener un tropismo positivo hacia los nematodos. Ensayos in vitro realizados con las especies *Harposporium anguillulae* y *Drechmeria coniospora* demostraron una alta eficacia en la disminución de larvas en cultivos. Sin embargo, el carácter de parásito obligado de este grupo de hongos limita su empleo como agentes de control biológico ya que su dispersión únicamente se realiza por contacto directo entre individuos parasitados, precisan de un medio con alta concentración de agua para difundirse y aquellos que deben ser ingeridos solo serían activos contra los estadios parasitarios de larva uno (J_1) y larva dos (J_2), que son los que se alimentan, y no sobre la larva tres (J_3) infectante que, al presentar cutícula doble, no se alimenta, por lo tanto no sería atacada.

Barron (1977), menciona que los endoparásitos utilizan sus esporas para infectar nematodos. Estos hongos son a menudo parásitos obligados de nematodos, y fuera del cuerpo infectado del nematodo aparecen sólo como estructuras de diseminación. Las esporas de estos hongos pueden ser zoosporas móviles como las de *Catenaria spp.* que se enquistan sobre el nematodo adhiriéndose a él y penetran la cutícula; conidios adhesivos (por ejemplo en *Drechmeria coniospora*) o conidios que son ingeridos por los nematodos bacteriófagos como *Harposporium spp.*

En cuanto a la aplicación de los hongos endoparásitos son considerados como específicos para desarrollarse sobre nematodos, aunque varían en la especialidad del hospedero, atacan quistes y huevos. Los endoparásitos han sido estudiados principalmente en laboratorio e invernadero (Kerry, 1990).

Los endoparásitos no producen micelios extensos, pero existen como conidios en el medio ambiente e infectan nematodos al adherirse a la superficie de la presa, o ingestión directa de los conidios, los cuales germinan rápidamente e invaden todo el nematodo absorbiendo los contenidos del cuerpo (Gray *et al.*, 1984).

Algunos de los principales Géneros de hongos endoparásitos son: *Acrostalagmus*, *Cephalosporium*, *Gonimochaete*, *Haptoglossa*, *Harposporium*,

Meria, *Nematoctonus* (Barron, 1977); en esta clasificación podemos encontrar a *S. vermicola* que fue encontrado por primera vez en el invernadero tropical de la Universidad de Guelph, Canadá, por Tzean y Barron (1980), el cual fue obtenido por la técnica del embudo de Baermann en nematodos *Rhabditis sp.*

Descripción *Spirogyromyces vermicola*

Tzean y Barron (1981) para establecer el método de infección en las primeras etapas de desarrollo, recogieron esporas y ramas de hifas de las placas viejas y se añadieron a cultivos frescos (no infectados) de *Rhabditis*. Las observaciones que realizaron en 1, 2, 3, 6, 12, y 24 h. intentaron

inocularlo en tres nematodos de morfología diferente, pero *Spirogyromyces vermicola* no logro infectarlos; además, intentaron cultivarlo en diferentes medios, pero el hongo no logro desarrollarse; en *Rhabditis sp.* lograron obtener un porcentaje de infección de casi 100%.

Las observaciones de Tzean y Barron (1981), muestran que las esporas, no se adhieren a la cutícula de los nematodos, pero se ingieren junto con las bacterias durante la alimentación. Las esporas ingeridas se anclan en el revestimiento del intestino por un disco adhesivo en forma de pico, de esta manera se evita eventual defecación. No se sabe si el pico de la espora se une físicamente o por adhesión química. El pico no parece particularmente afilado o diseñado para perforar la pared intestinal; parece más probable la unión química. Una vez unido, la espora aparentemente absorbe nutrientes de los fluidos bombeados continuamente a través del intestino por los músculos del esófago y el bulbo. La espora adjunta, ahora el joven talo, se vuelve más amplia y septada con un pequeño bulbo al final en forma de signo de interrogación, que por lo general surgen cerca de un septo y llegan a medir 43 a 70 micrometros de largo y de 2 a 2.8 micrometros regularmente uniforme, pero pueden reducirse ligeramente cerca del vértice antes de expandirse para formar la punta bulbosa. Las esporas maduras son finalmente liberadas, o desalojadas por el movimiento, y defecadas a través del orificio anal. A veces ramas enteras con esporas

asociadas o esporas en desarrollo pasan a través del ano (Tzean y Barron, 1981).



Figura 3: Rama y conidia liberada en el medio de *Spirogyromyces vermicola*



Figura 4: Crecimiento de *Spirogyromyces vermicola* sobre *Rhabditis sp.*

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en campo y laboratorio del 20 de agosto de 2014 al 11 de febrero del 2016.

En campo se realizaron los muestreos de suelo para la obtención de hongos nematófagos, dos de ellos en el Bajío de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) Campus Saltillo y uno en la Sierra de Zapaliname. En la cámara bioclimática número siete del Departamento de Parasitología Agrícola se mantuvo a *S. vermicola*, a cepas de nematodos, *E. coli* y cultivo de nematodos.

Cultivo de *Tenebrio molitor* (Linnaeus) (Coleoptera: Tenebrionidae)

Para establecer el cultivo de *Tenebrio molitor* se compraron 500 larvas en Monterrey, Nuevo León, las cuales se mantenían en la cámara número siete, proporcionándoles alimentos tres veces a la semana, el cual consistió en harina de trigo, avena y papas respectivamente.

La cría de *T. molitor* se mantuvieron durante 22 meses, para tener una población que permitiera autosuficiencia, para las necesidades de la investigación.



Figura 5: Cría de *Tenebrio molitor* en la cámara número siete de la UAAAN-Saltillo

Cultivos de Nematodos Bacteriófagos

Rhabditis sp.

Los nematodos bacteriófagos del género *Rhabditis sp.* que se utilizaron como cebo, se obtuvieron del Bajío de la UAAAN-Salttillo realizando una recolección de muestras de suelo a una profundidad de 0-10cm que fueron transportadas a la cámara bioclimática colocadas en frascos de plástica de medio litro; en cada frasco se colocaron de 200g de suelo húmedo y cinco larvas de *T. molitor* cortados a la mitad con un bisturí, ubicando un total de seis repeticiones; las muestras fueron observadas todos los días, al tercer día se detectó la presencia de nematodos, los cuales con la ayuda de una aguja de insulina se colocaron en cajas de Petri con dos capas de papel estraza previamente esterilizada y humedecida y con dos larvas de *T. molitor* cortados. Esta población de nematodos, se identificó como *Rhabditis* con la ayuda del manual de identificación de Bongers (2011), tomando en cuenta las características morfológicas del nematodo, como cavidad bucal tubular con paredes paralelas y bulbo basal con válvula cardia en forma de triángulo.

Para mantener el cultivo de *Rhabditis*, a las cajas de Petri, se les colocaba papel estraza esterilizado con 3mL de agua, para evitar la deshidratación de los nematodos, ya que tienen una cutícula sensible; además se agregaron dos larvas de *T. molitor* desinfectados superficialmente y cortados a la mitad con un bisturí. Este proceso se realizaba tres veces a la semana, ya que los nematodos se alimentan de las bacterias que se encuentran en el interior del intestino de las larvas; con una aguja de insulina se colocaban de 30 a 40 nematodos de diferentes etapas de desarrollo, desde J₂ hasta adultos en las cajas de Petri; además se verificaba que no fueran invadidos por ácaros, hongos u otro microorganismos dañinos para la población.



Figura 6: Cultivo de *Spirogyromyces vermicola* sobre *Rhabditis sp.*

Caenorhabditis elegans

La población de nematodos de *Caenorhabditis elegans* y *Escherichia coli* OP50, se mantuvo en medios PDAYH (Papa Dextrosa agar-extracto de levadura y yema de huevo). Los medios fueron preparados a una proporción de 39g de PDA, 10g de extracto de levadura y una yema de huevo por cada litro de agua. 24 horas antes de inocular los nematodos se sembraba la bacteria *Escherichia coli* OP50 por técnica de estrías en placas; para ello, con una asa estéril se tomaba una muestra de la población y después se hacían estrías en zig-zag con el asa; cada vez se depositaban en la superficie del medio, menos las bacterias, las cuales quedaban separadas; después se flameaba el asa y se realizaba el mismo procedimiento con otra caja de Petri, que contenía medio de cultivo. *Caenorhabditis elegans* y *Escherichia coli* OP50 que fueron proporcionados por la Dra. Rosa Estela Navarro González de la Universidad Nacional Autónoma de México.



Figura 7: *Caenorhabditis elegans* mostrando sus dos bulbos faríngeos.

Aislamiento de Hongos Nematófagos

Las muestras de suelo se procesaron mediante el método de “espolvoreado en placa” descrito por Barrón (1977) para el aislamiento de hongos nematófagos. La técnica consistió en colocar de 0.5g a 1.0g de suelo por caja de Petri con papel estroza húmedo (2mL de agua por cada caja de Petri) previamente esterilizado en olla de presión. Se preparó una suspensión de nematodos (*Rhabditis*) cuantificándolos en la cámara de Neubauer y con micropipeta se agregaba 1mL de una suspensión de nematodos (200-300 nematodos bacteriófagos previamente cultivados). A partir de la segunda semana, se iniciaron las observaciones bajo el estereoscopio buscando hifas, conidios, esporas o nematodos parasitados. Las observaciones se hicieron durante tres semanas, con el fin de aumentar la posibilidad de encontrar alguna estructura fúngica. Las cajas de Petri obtenidas por área de muestreo fueron 40, las cuales eran dos del Bajío de la UAAAN y uno de la Sierra de Zapaliname del Municipio de Saltillo, Coahuila; los realizados en el Bajío fueron en cultivos de tomate y maíz, obteniendo un total de 120 cajas de Petri. Una vez observada la presencia de hongos nematófagos, se procedió a su identificación, aislamiento y purificación. En el campo experimental el Bajío de la UAAAN-Saltillo se encontró a *Arthrobotrys oligospora* y en la sierra de Zapaliname a *Arthrobotrys*

dactyloides, *Monacrosporium sp* y *Spirogyromyces vermicola* determinados empleando las claves de Cooke y Godfreys (1963), excepto con *S. vermicola*, ya que para corroborar que era el hongo se enviaron fotos al Dr. Barron y al Dr. Tzean del Departamento de Biología Ambiental de la Universidad de Guelph, Canadá.

Aislamiento *Spirogyromyces vermicola*

A diferencia del resto de los hongos, *Spirogyromyces vermicola*, se aisló de caja de Petri con nematodos vivos, dos semanas después del muestreo. De una de las cajas de Petri, traída de un bosquecillo de la Sierra cercana a Saltillo, Coahuila donde predomina el *Quercus taeda* y *Quercus saltillensis*, en la pendiente de la Sierra Madre Oriental, a 1700 metros sobre el nivel del mar. Otros componentes de la vegetación son *Juniperus spp.*, y *Arbutus xalapensis*. El suelo es poco profundo, piedra caliza (calcáreas) litosol, con una capa superpuesta 3-5 cm de hojarasca. En este lugar, la precipitación anual es de alrededor de 400mm y la niebla es frecuente. Se tomaron muestras cada diez metros, cada muestra se componía de 1.0g de suelo y de hojarasca.

En una de las cajas de Petri (n=40) se pudieron observar nematodos vivos de los cuales se tomaron cinco para colocarlos en cajas de Petri nuevas, y al cabo de cinco días se realizó montas en porta y cubreobjetos para observar al microscopio los nematodos que contenían al hongo dentro.

Descripción de *Spirogyromyces vermicola*

Para la descripción del hongo; una vez inoculado en nematodos del género *Rhabditis sp.* las observaciones se realizaban diariamente en él microscopio de contraste de fases, preparando montas para conocer su ciclo de vida, morfología del hongo e influencia sobre la población de nematodos.

Efecto de *Spirogyromyces vermicola* en *Rhabditis* sp.

Para evaluar el efecto de *S. vermicola* en *Rhabditis* se hicieron dos tratamientos, cada uno con diez repeticiones, uno con *S. vermicola* y el otro sin *S. vermicola*; se colocaron diez nematodos adultos a cada caja de Petri inoculados con el hongo, papel estraza húmedo (2mL de agua) como medio de cultivo y dos larvas de tenebrios cortados; para el tratamiento que no tenía el hongo, el procedimiento se repitió con la diferencia de que ningún nematodo estaba infectado por el hongo; se establecieron diez repeticiones de cada tratamiento. Transcurridos cinco días, se procedió a colocar dos larvas de tenebrios cortados para que los nematodos tuvieran suficiente alimento; esto se realizó en todas las cajas (veinte).

Trascurridos once días se tomaron las piezas de papel de estraza de las cajas de Petri y se colocaron en frascos de vidrio con capacidad de 200mL que contenían 20mL de agua esterilizada, se agitaban suavemente para que los nematodos presentes en el papel estraza se quedaran en el líquido. De esta suspensión se tomaron 10µl con una micropipeta y se colocaron en la cámara de Neubauer para su posterior conteo. Para determinar el porcentaje de infección, se realizaron montas temporales de nematodos, que contenían en su interior el hongo en porta y cubreobjetos, de las cuales se tomaron al azar diez nematodos para ver cuántos tenían el hongo. De esta manera se obtuvieron tanto el número de nematodos (población) en tratamientos como el porcentaje de infección en las poblaciones.

Efecto de *Spirogyromyces vermicola* en *Caenorhabditis elegans* en Laboratorio

La evaluación consistió en dos tratamientos, uno con y otro sin *S. vermicola*, para lo cual se colocaron diez nematodos adultos inoculados en cajas de Petri de 9cm con medios PDAYH; 24 horas antes se sembró *Escherichia coli* OP50; donde de cada tratamiento se tuvieron con diez repeticiones.

A los 11 días, se colocaron 20mL de agua esterilizada a las cajas de Petri, se agitaron suavemente, para después pasar los nematodos en frascos de vidrio con capacidad de 200mL; de esta suspensión se tomaron 10 μ l con una micropipeta y se colocaron en la cámara de Neubauer para su posterior conteo. Para determinar el porcentaje de infección, se tomaron diez nematodos al azar, de los cuales se contaron cuantos tenían el hongo. De esta manera se obtuvieron tanto el número de nematodos (población) en tratamientos como el porcentaje de infección en las poblaciones.

Análisis Estadístico

El análisis de los datos, se realizó utilizando una prueba de t- Student para varianzas homogéneas, con un valor de significancia de 0.05 en el programa SPSS versión 20.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Descripción de *Spirogyromyces vermicola*

Spirogyromyces vermicola se detectó en sólo una muestra de suelo proveniente de la Sierra Zapaliname (n = 40). En los nematodos infectados del género *Rhabditis* sp., el hongo produce abundantes conidias filiformes con forma ligeramente de signo de interrogación. Las esporas generalmente pueden estar circunscritas en un rectángulo de 40.7 (30-55) x 21.25 (11-24,5) micras de largo y de ancho 1.5 a 2.5 (n = 20) (Anexo 1). Dichas conidias parecen estar compuestas de dos partes principales, una superior (hialina) y otra inferior (obscura). Cuenta con una área hinchada ("perilla") distal a su punto de fijación en el conidióforo, el cual mide de 1.0 a 2.5 micras de diámetro; debajo de la perilla hay un cuello o estrechamiento de la espora (0.3-0.7 micras de diámetro). Los septos de las esporas se dividen en varios compartimentos regularmente dos o tres, seguidos de la hinchazón o la perilla, (distal) la cual esta desprovista de citoplasma, y los compartimentos restantes contienen citoplasma vivo (Figura 8).

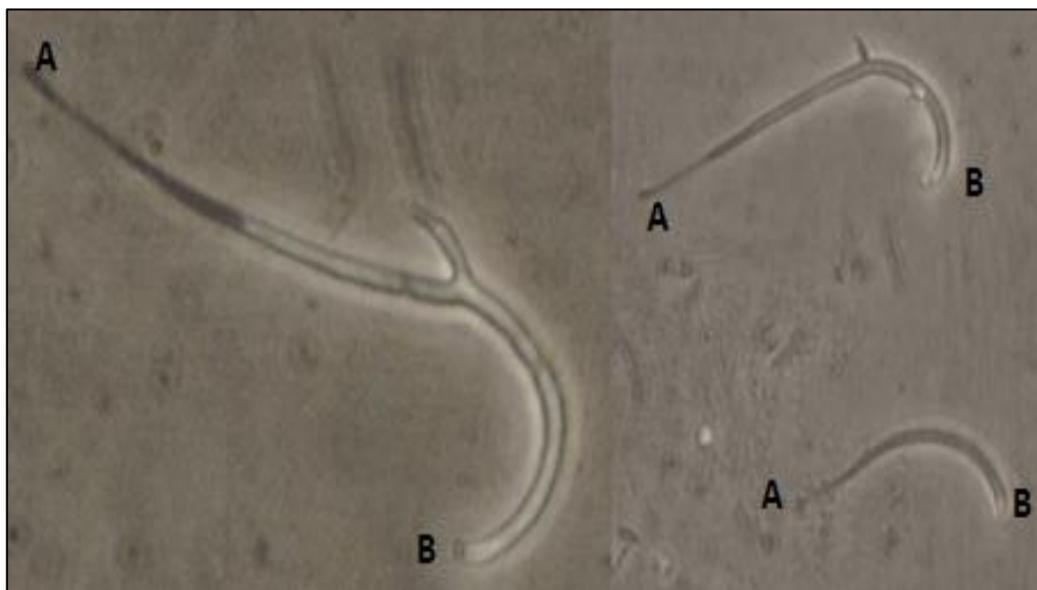


Figura 8: Conidia septada de *Spirogyromyces vermicola* A) "perilla" apical con el extremo vacío de citoplasma (distal respecto al apego al conidióforo) B) "pico" de la conidia encargada de adherirse al intestino del huésped (40x).

Tzean y Barron (1981), mencionan que la parte vacía de la perilla podría tener una función de atracción para los nematodos, además de dar orientación una vez dentro del intestino; también describen en la parte apical un pico o gancho, el cual una vez en el intestino, se adhiere a este para evitar su eventual eliminación en la defecación; otra respuesta para evitar esta eliminación de la espora, sería mediante adhesión química en el intestino.

El crecimiento del hongo consta de tres fases: primaria, secundaria y terciaria. Una vez ingeridas las esporas comienza el crecimiento primario, que consiste en el alargamiento y ensanchamiento intercalar de las esporas (Figura 9A-C); es importante mencionar que el alargamiento no es al parecer debido al crecimiento apical, porque las dos estructuras originales de las esporas parecen conservarse a través del desarrollo.

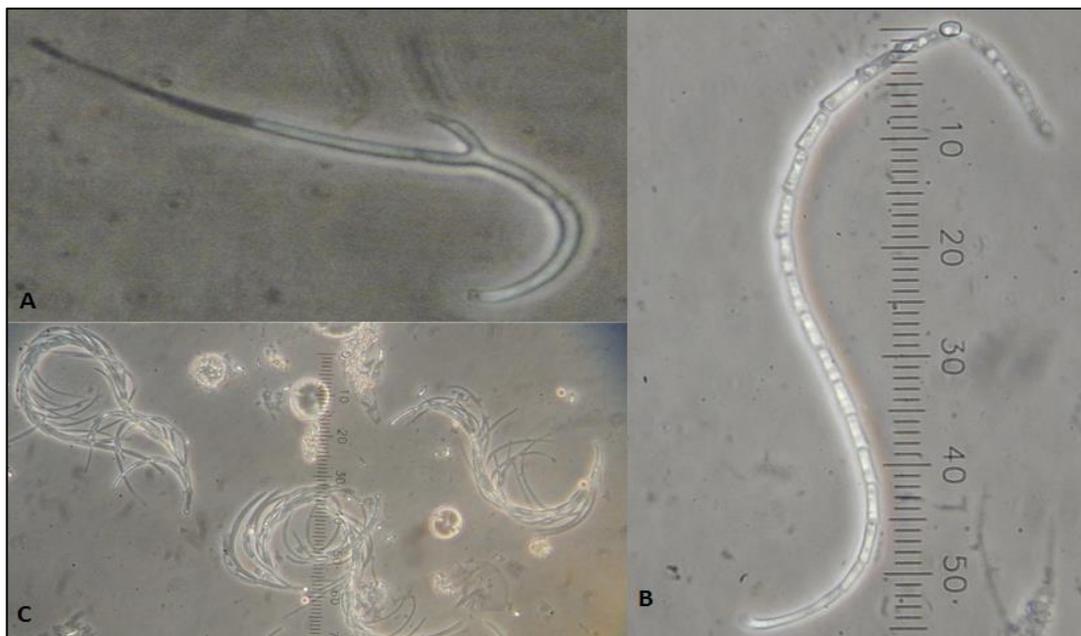


Figura 9: A) Conidia de *S. vermicola* madura, B) Conidia alargada y C) joven talo con la formación de ramas laterales (crecimiento secundario) (40x). Todo el crecimiento se lleva a cabo dentro del nematodo

Por lo tanto, en el intestino de los nematodos, la espora empieza a crecer, alargándose y dividiéndose intercaladamente en una posición intermedia entre las puntas de las esporas, en el inicio de la región completa del citoplasma de la

espora (Figura 10). El crecimiento producirá septos, formando ondulaciones e hifas septadas, por lo que la espora se convierte en un filamento alargado o talo. Después se producen ramas cortas y esporas inmediatamente adyacentes a los septos del talo, y más tarde, las esporas se producen también adyacentes a septos en las ramas. El crecimiento primario sigue y se refleja la curvatura de la espora original. El crecimiento secundario, es la formación de ramas laterales cortas junto a septos (Figura 10B); cada rama a su vez produce esporas ligeramente curvadas o en forma de signo de interrogación como crecimiento terciario. Eventualmente, talos completamente desarrollados consisten en una hifa ondulante (alrededor de 400 micras de largo), sobre la cual se producen directamente o en ramas laterales cortas.

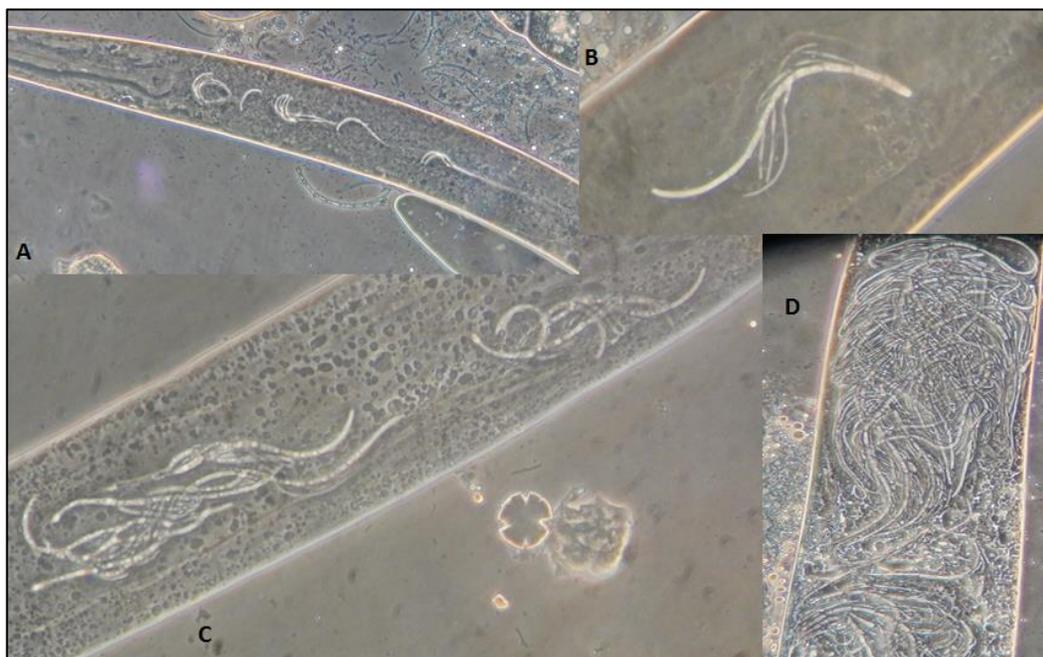


Figura 10: Crecimiento de *Spirogyromyces vermicola* en *Rhabditis* sp. A) Esporas en el intestino del nematodo, B) Formación de ramas laterales cortas junto a los septos, C) Diferentes esporas en germinación en un mismo nematodo y D) *S. vermicola* ocupando el intestino del nematodo sin penetrar la faringe.

En un mismo individuo, se pueden desarrollar muchas esporas y madurar al mismo o diferentes tiempos (Figura 10A y 10C), dichas esporas, por alguna razón, comienzan a enrollarse en el mismo sentido (nunca en sentido opuesto).

Finalmente el hongo llena el espacio intestinal, pero no logra habitar en la faringe (Figura 10D).

Efecto de *Spirogyromyces vermicola* Sobre la Población de *Rhabditis sp.* en Laboratorio

Se observó que las hembras de nematodos fuertemente colonizadas por *S. vermicola* (su intestino completamente lleno de talos), todavía son capaces de reproducirse de forma aparentemente normal, terminando su ciclo de vida. Por lo tanto, aunque el número medio de nematodos por caja de Petri fue 21.2% menor en las poblaciones inoculadas, tal como se puede observar en la Figura 11, donde las poblaciones con mayor número de nematodos, se encuentran sin inóculo, a excepción de las repeticiones cuatro y siete.

Al menos 59% estaban infectados, sin diferencias significativas en las cifras de población de nematodos entre los inoculados con *S.vermicola* y los tratamientos no inoculados, con una media de 37,000 y 47,000 nematodos por caja de Petri, respectivamente, con una prueba t, $p = 0.351$ (Cuadro 1). Estos resultados difieren de los obtenidos por Tzean y Barron (1981), ya que ellos obtuvieron un porcentaje de infección del 100%; esto podría deberse a que ellos utilizaron medios nutritivos y en poblaciones naturales, encontraron que el 5-10% de las poblaciones hospedantes de *Rhabditis* de suelo en invernadero estaba infectado.

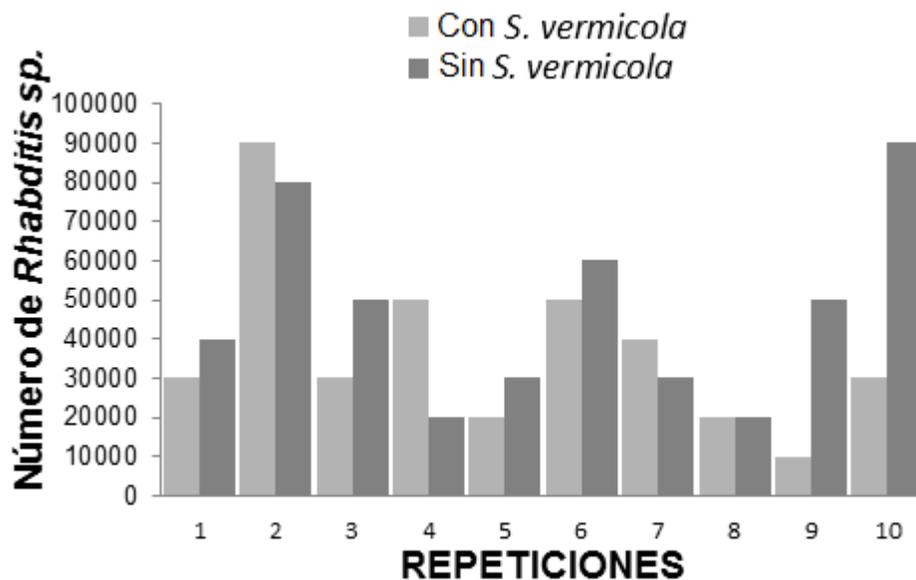


Figura 11: Efecto de *Spirogyromyces vermicola*, sobre la población de *Rhabditis sp.*, en laboratorio.

Cuadro 1 : Prueba de Levene, Grados de libertad y significancia en una prueba de t Student con varianzas homogéneas de la población de *Rhabditis sp.* con y sin inoculación de *Spirogyromyces vermicola*, arrojados por SPSS.

	Prueba de Levene		Prueba de T para igualdad de medias		
	F	Sig.	T	G.L	Sig. (Bilateral)
Se han asumido varianzas iguales	0.173	0.683	-0.957	18	0.351
No se han asumido varianzas iguales			-0.957	17.933	0.351

gl=grados de libertad; sig= significancia

En las observaciones realizadas en microscopio compuesto, se puede decir que *S. vermicola* es probablemente un miembro de Harpellales y tiene menor similitud a Aselariales (actualmente Kickxellomycotina).

Bajo el microscopio compuesto, el organismo es reminiscencia de hongos de artrópodos (comensalistas) como Harpellales, por ejemplo *Smittium culisetae* y en menor medida, Aselariales (ahora Zygomycota: Kickxellomycotina, anteriormente "Trichomycetes", que ahora se consideran un conjunto polifilético que los invalida de los verdaderos hongos y protistas). *Spirogyromyces vermicola* es parecido a los Trichomycetes; en el hábitat, el cual es el intestino de invertebrados; (Phillipe *et al.*, 2005) la unión del talo de hongos a la mucosa intestinal; y la liberación de las esporas a partir del intestino del hospedero hacia el medio ambiente (Tzean y Barron, 1981).

Por otra parte, el hospedero (nematodos y no artrópodos), y la falta de esporas con filamentos (trichosporas) y zigosporas en *S. vermicola* lo separa de Harpellales y Asellariales (Tzean y Barron 1981). Barron (2008) opina que el *S. vermicola* no es probablemente un verdadero hongo. Probablemente es un verdadero miembro altamente derivado y especializado de los Hongos, probablemente en los Kickxellales. También es posible que *S. vermicola* sea un eucariota filamentoso no fúngico, como los "pseudohongos" (Heterokonta) como Oomycetes (Cavalier-Smith y Chao 2006)

A partir de nuestras observaciones, *S. vermicola* parece ser un parásito no letal, tal vez un comensal o un simbiote no esencial. Los nematodos *Rhabditis sp.* son probablemente los hospederos originales en la naturaleza (Tzean y Barron 1981).

**Efecto de *Spirogyromyces vermicola* Sobre la Población de
Caenorhabditis elegans, en Laboratorio**

El desarrollo de *S. vermicola* en *C. elegans* es lento, ya que una vez inoculado, tarda de 13 a 16 días para colonizar el nematodo (Figura 13) a diferencia de *Rhabditis* que en una semana el hongo coloniza al nematodo, ocupando casi el 90% de su sistema digestivo; se ha observado que *S. vermicola* una vez en poblaciones de *C. elegans*, solo puede permanecer en la población de 15 a 20 días, ya que las siguientes generaciones no conservan el hongo; en las montas realizadas después de 20 días solo se pueden observar conidias en la epidermis de nematodos muertos y en el medio de cultivo, sin embargo, en nematodos vivos, el hongo se encuentra ausente.

Cuadro 2: Prueba de Levene, grados de libertad y significancia en una prueba de t Student con varianzas homogéneas de la población de *Caenorhabditis elegans* con y sin inoculación de *S. vermicola* arrojados por SPSS.

	Prueba de Levene		Prueba de T para igualdad de medias		
	F	Sig.	T	G.L	Sig. (Bilateral)
Se han asumido varianzas iguales	0.14	0.709	-0.65	18	0.524
Número de Nematodos					
No se han asumido varianzas iguales			-0.65	17.87	0.524

GL=Grados de Libertad; Sig= significancia

En cuanto a la población *S. vermicola*, no afecta el desarrollo de *C. elegans*, ya que estos pueden completar su ciclo de vida y reproducirse; por otro lado al menos 45% de *C. elegans* estaban infectados, sin diferencias significativas en las cifras de población de nematodos, entre los inoculados con *S. vermicola* y los tratamientos no inoculados, con media de 54,000 y 59,000 nematodos por caja de Petri respectivamente y una prueba t, $p = 0.524$ (Cuadro 2), pero si hay una diferencia numérica de 8.5%.

En la Figura 12, se puede observar como las repeticiones uno, tres, cinco y siete presentan el mismo número de nematodos, tanto en los inoculados, como los no inoculados; la repetición cuatro es la única que presentó mayor población de los inoculados con *S. vermicola*, mientras que en resto de las repeticiones, las poblaciones fueron más altas sin el hongo.

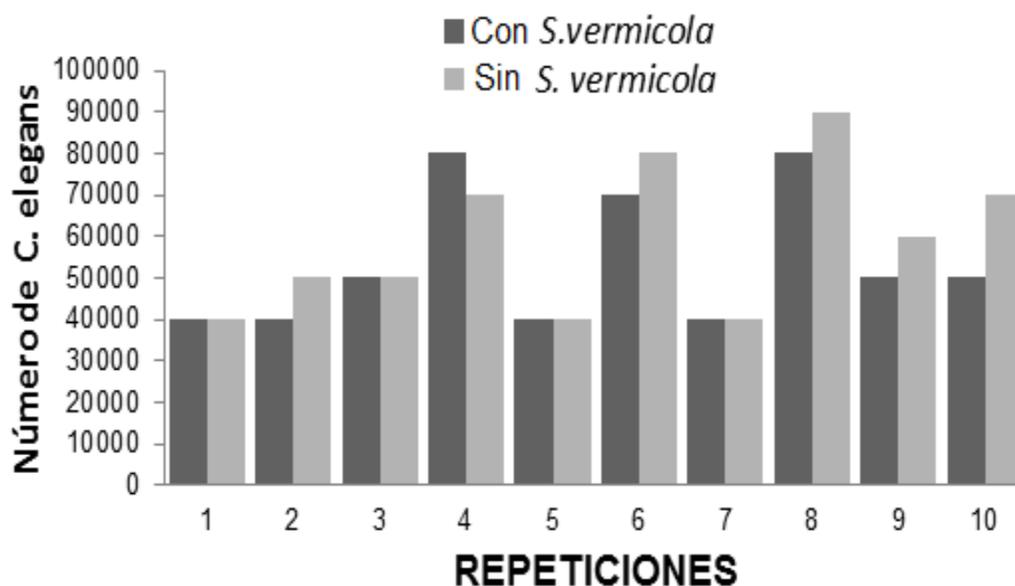


Figura 12: Efecto de *Spirogyromyces vermicola* sobre la población de *C. elegans*

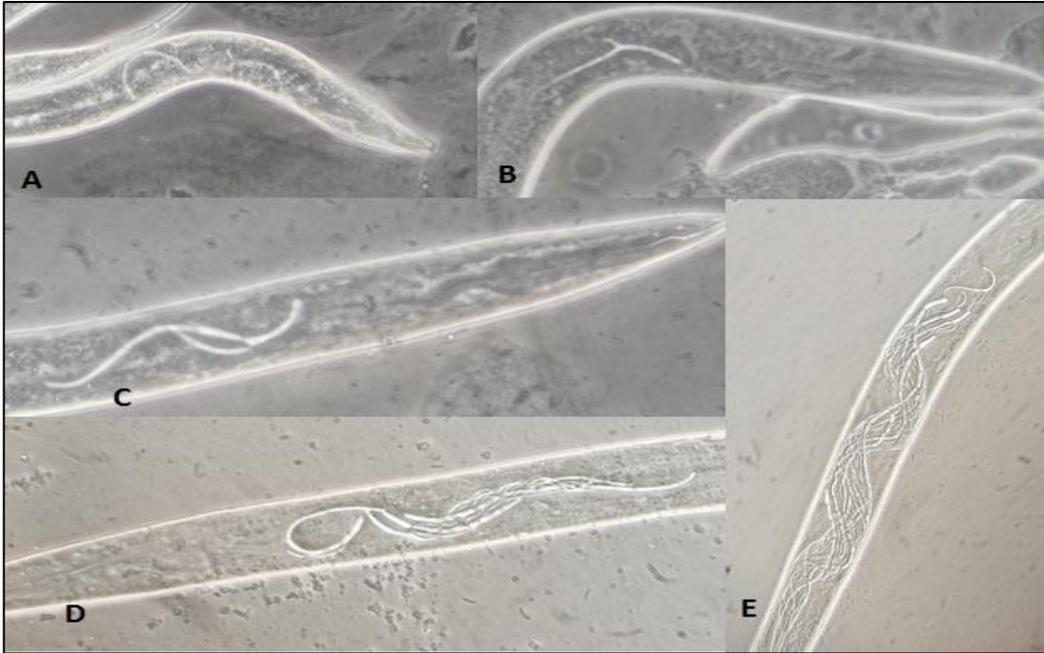


Figura 13: Desarrollo de *Spirogyromyces vermicola* sobre *C. elegans* : A) Conidia joven en el intestino, B) conidia madura germinando, C) joven talo con una rama lateral, D) Y E) talos ampliamente ramificados, en el interior del intestino del huésped, E) llenado posterior del intestino por *S. vermicola* sin ocupar el esófago del huésped.

CONCLUSIONES

Se demuestra que *Spirogyromyces vermicola* es un comensal intestinal no letal; no indispensable en nematodos, que no penetra la faringe ni el intestino; sin embargo, sí llena el intestino de sus hospederos (*Caenorhabditis elegans* y *Rhabditis*).

La relación establecida entre el hongo y nematodo es de comensalismo donde el hongo se beneficia, alimentándose de los fluidos intestinales del nematodo, sin embargo, el nematodo no se ve afectado significativamente por *S. vermicola*.

S. vermicola se establece en *C. elegans* y con el paso del tiempo aparentemente no sobrevive en poblaciones de este hospedero alterno.

Aunque *S. vermicola* logra infectar y proliferar en sus hospederos, la población de éstos no se ve afectada numéricamente; además, los nematodos infectados completan su ciclo de vida, incluyendo su ciclo reproductivo.

REFERENCIAS

- Agrios, G.N. 2005. Plant Pathology. 5th ed. Elsevier Academic Press, New York.
- Arévalo, J., Silvall S.D., Carneiro, M.D.G., Lopes, R.B., Tigano M. S., Hidalgo, D.L. y Carneiro, R.M.D.G 2012. *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare y Gams como potencial agente de control biológico de *Meloidogyne enterolobii* (Yang y Eisenback) en cultivos hortícolas. Rev. Protección Veg. Vol. 27 No. 2: 123-129.
- Barron, G.L. 2008. War of the microworlds: How do I kill Thee Let me count the ways. University of Guelph, Ontario.
<http://www.uoguelph.ca/~gbarron/2008/2008.htm>. Accessed 15 September 2015.
- Barron, G.L. 1977. The Nematode-Destroying Fungi. Topics in Mycobiology No.1. Canadian Biological Publications Ltd., Editorial Lancaster Press. Guelph. 140 p.
- Carrión, G. y Desgarenes, D. 2012. Efecto de *Paecilomyces lilacinus* en nemátodos de vida libre, asociados a la rizósfera de papas cultivadas en la región del Cofre de Perote, Veracruz, México. Revista Mexicana de Fitopatología 30:86-90.
- Cavaliere, S.T. y Chao, E.E. 2006. Phylogeny and megasystematics of phagotrophic heterokonts (Kingdom Chromista). J. Mol. Evol. 62:388-420.
- Chen, S; Dickson, D.W. 2004. Biological control of nematodes by fungal antagonist. Eds. Nematology. Advances and perspectives, Vol. II. Beijing, China. p. 979-1039.
- Coyne, D.L., Nicol, J.M. y Claudius, C. B. 2007. Practical Plant Nematology: a field and laboratory guide. SP-IPM Secretariat, International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Cotonou, Benin.
- Dávila, L. y Climaco, H. J. 2005. Evaluación de la actividad biocontroladora de *Arthrobotrys* sp. y *Paecilomyces* sp., Sobre *Meloidogyne javanica* *in vitro* y bajo condiciones de invernadero en crisantemo (*Dendranthema grandiflora*) Anderson. Agronomía Colombiana 23(1): 91-101.
- Frans, A. A. M., De Leij., y Kerry, B.R. 1991. The nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* as a potential biological control agent for *Meloidogyne arenaria*. Revue. Nématol. 14 (1): 157-164pp.
- Gaspard, J. T., Jaffee A. y Ferris. H. 1990. Association of *Verticillium chlamydosporium* and *Paecilomyces lilacinus* with Root-knot Nematode Infested Soil. Journal of Nematology 22(2):207-213.

- Gray, N.F. y Smith, L.R.I. 1984. The distribution of nematophagous fungi in the maritime Antarctica. *Mycopathologia*. 85: 81-92.
- Gray, N.F., Wyborn, C., Smith, L.R.I. 1982. Nematophagous fungi from the maritime Antarctic. *Oikos* 38:194-201.
- Guzmán, P. O, Castaño, Z, J. y Villegas, E. B. 2009. Principales nematodos fitoparásitos y síntomas ocasionados en cultivos de importancia económica. *Revista de Agronomía*. 125.
- Herreros, E., Escobar, C., Muñoz-Martin, M., Mullineaux, P., Fernández, L.M. y Fenoll, C. 2001. Inducción de promotores virales en plantas transgénicas infectadas por nematodos fitopatógenos. VI Reunión de Biología Molecular de Plantas. Toledo. España: 156
- Kerry, B.R. 1990a. An assessment of progress toward microbial control of plant-parasitic nematodes. *Journal of Nematology* 22:621-631.
- Kerry, B.R. 2000. Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant parasitic nematodes. *Annual Review Phytopathology* 38:423-441.
- Kumar, N. y Singh, K.P. 2011. Use of *Dactylaria brochopaga*, a Predacious Fungus, for Managing Root-Knot Disease of Wheat (*Triticum aestivum*) Caused by *Meloidogyne graminicola*. *Mycobiology* 39(2): 113-117.
- Lysek, H. y Sterba J. 1991. Colonization of *Ascaris lumbricoides* eggs by the fungus *Verticillium chlamydosporium* Goddard. *Folia Parasit.* 38:255–9.
- Orozco, A.M., Álvarez, V., Jiménez R.A. y Acuña, N.O. 2009. Evaluación in vitro de hongos nematófagos para el control biológico de nematodos gastrointestinales de rumiantes. *Rev. MVZ Córdoba Vol.14 No.3*. 1820-1830 pp.
- Peraza, P,W., Orozco, A.M., Esquivel, H.A., Chaverri, F.F. y Rivera, C.G. 2011. Aislamiento e identificación de hongos nematófagos nativos de zonas arroceras de Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana* 22(2):233-243. 2011.
- Philippe, H., Lartillot, N. y Brinkmann, H. 2005. Multigene analyses of bilaterian animals corroborate the monophyly of Ecdysozoa, Lophotrochozoa, and Protostomia. *Mol Biol Evol.* 22:1246-1253.
- Puertas, A. y Hidalgo, D. L. 2009. Efecto del momento de aplicación de *Pochonia chlamydosporia* Var. *catenulata* sobre su eficacia en el control de *Meloidogyne incognita*. *Rev. Protección Veg.* Vol. 24 No. 3: 177-179.
- Román, J. y Acosta, N. 1984. Nematodos diagnóstico y combate. Universidad de Puerto Rico. 68 pp.

- Sagüés, M.F., Purslow, P., Fernández, S., Fusé, L., Iglesias, L. y Saumell, C. 2011. Hongos nematófagos utilizados para el control biológico de nematodos gastrointestinales en el ganado y sus formas de administración. *Rev. Iberoamericana de Micología*; 28 (4):143–147.
- Sijmons, P.C. 1993. Plant nematode interactions. *Plant Molecular Biology* 23: 917-931.
- Singh, K. P., Jaiswal, R. K., Kumar, N. y Kumar, D. 2007. Nematophagous Fungi Associated with Root Galls of Rice Caused by *Meloidogyne graminicola* and its Control by *Arthrobotrys dactyloides* and *Dactylaria brochopaga*. *J. Phytopathology* 155, 193–197 pp.
- Tzean, S.S. y Barron, G.L. 1981. A new and unusual fungus living in the gut of free-living nematodes. *Can. J. Bot.* 59:1861-1866.
- Wyss, U. y Zunke, U. 1986. Observations on the behaviour of second stage juveniles of *Heterodera schachtii* inside host roots. *Revue Nematol.* 153-165.

Anexos

Anexo 1: Medidas morfo-métricas de las conidias de *Spirogyromyces vermicola*

No. De conidias	Largo conidia μm	Ancho conidia μm	Diámetro perilla μm	Ancho punto perilla μm
1	30	2	1.5	0.3
2	40	2	1.5	0.6
3	52.5	2.5	1.5	0.5
4	55	2.5	2	0.7
5	33.75	2.4	1.8	0.6
6	28.75	2.5	2	0.7
7	42.5	2.5	2.5	0.7
8	37.5	1.5	2	0.4
9	41.25	2.4	1.5	0.6
10	43.75	2.3	1.5	0.5
11	48.75	2	2	0.7
12	40	2	2	0.5
13	36.25	2.5	1.7	0.5
14	37.5	2	1.2	0.4
15	42.5	2.3	1.5	0.5
16	40	1.8	1.3	0.5
17	52.5	2.2	1.2	0.6
18	32.5	2.5	1	0.4
19	40	2.1	1	0.5
20	38.75	2.2	1.5	0.5
Media	40.6875	2.21	1.61	0.535

Anexo 2: Número de *Rhabditis* por cajas Petri con y sin inoculación de *Spirogyromyces vermicola*.

Con hongo	Sin hongo
30000	40000
90000	80000
30000	50000
50000	20000
20000	30000
50000	60000
40000	30000
20000	20000
10000	50000
30000	90000

Anexo 3: Número de *Rhabditis* infectados de *Spirogyromyces vermicola*, tomando en cuenta que solo se contaron diez nematodos por caja.

No. De cajas	Total de nematodos contados	No. De nematodos con hongo
1	10	6
2	10	7
3	10	6
4	10	7
5	10	4
6	10	7
7	10	8
8	10	5
9	10	5
10	10	4
Total	100	59

Anexo 4: Población de *Caenorhabditis elegans* con y sin *Spirogyromyces vermicola*.

No. De cajas Petri	Con hongo	Sin hongo
1	40000	40000
2	40000	50000
3	50000	50000
4	80000	70000
5	40000	40000
6	70000	80000
7	40000	40000
8	80000	90000
9	50000	60000
10	50000	70000

Anexo 5: Número de *Caenorhabditis elegans* infectados de *Spirogyromyces vermicola*, tomando en cuenta que solo se contaron diez nematodos por caja.

No. De cajas Petri	Total de <i>C. elegans</i>	<i>C. elegans</i> con <i>S. vermicola</i>
1	10	4
2	10	5
3	10	5
4	10	4
5	10	6
6	10	4
7	10	5
8	10	4
9	10	3
10	10	5
Total	100	45