

Artículo Científico**Determinación del potencial nematocida y nematostático
in vitro de *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.)
sobre larvas J2 de *Globodera pallida* (Stone)*****In vitro* determination of the nematocidal and nematostatic
potential of *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Ex Fr.)
on J2 larvae of *Globodera pallida* (Stone)**María Belén Arteaga¹, Carlos A. Soria¹ y María Eugenia Ordoñez^{1*}¹Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Escuela de Ciencias Biológicas, Quito, Ecuador.

*meordonez@puce.edu.ec

<https://doi.org/10.26807/remcb.v41i1.837>

Recibido 12-08-2019 – Aceptado 13-05-2020

RESUMEN.- *Globodera pallida* genera pérdidas de hasta el 30 % en el rendimiento del cultivo de papa en el Ecuador. El control químico de la plaga supone riesgos de toxicidad al suelo y para el agricultor. En este estudio se determinó el potencial nematocida y nematostático *in vitro* del micelio en agar agua y del filtrado del caldo de cultivo de *Pleurotus ostreatus* en medio Sabouraud sobre larvas J2 de *G. pallida*. En el efecto del micelio se observó un mayor porcentaje de nematodos inmóviles (34 %) a las 24 horas de exposición, y el efecto nematocida más efectivo a las 72 horas, con una mortalidad del 80,3 %. No existió relación entre el porcentaje de J2 inmóviles, el tiempo de exposición y la concentración del filtrado en la actividad nematostática; sin embargo, el tratamiento con 100 % de concentrado y 8 h de exposición, dio como resultado un mayor porcentaje de nematodos inmóviles (65,2 %). El efecto nematocida del filtrado a una concentración del 100 % y 24 horas de exposición, fue la más efectiva, con una tasa de mortalidad de larvas del 41,6 %. El micelio y el filtrado de *P. ostreatus* presentaron actividad nematostática y nematocida *in vitro* frente a larvas de *G. pallida*.

PALABRAS CLAVE: Control biológico, *Globodera pallida*, nematodos fitoparásitos, *Pleurotus ostreatus*, papa.

ABSTRACT.- *Globodera pallida* generates yield losses of up to 30 % in Ecuadorian potato crops. Chemical control of this pest involves risks of toxicity to the soil and to the farmer. In this study, the nematocidal and nematostatic *in vitro* potential of the mycelium in water agar and culture broth filtrates of *Pleurotus ostreatus* in Sabouraud media on *G. pallida* J2 larvae was determined, as a control alternative. Regarding the effect of the mycelium, a greater percentage of immobile nematodes (34 %) was observed after 24 hours of exposure, and the nematocidal effect was more pronounced after 72 hours exposure with a mortality of 80.3 %. There was no relationship between the percentage of immobile J2, exposure time and the concentration of the filtrate in the nematostatic activity; however, the 100 % filtrate concentration and 8 h treatment exhibited a higher percentage of immobile nematodes (65.2 %). The nematocidal effect of the filtrate with a concentration of 100 % and 24 hours of exposure time, was the most effective with a larvae mortality rate of 41.6 %. The mycelium and filtrate of *P. ostreatus* showed nematostatic and nematocidal *in vitro* activity against *G. pallida* larvae.

KEYWORDS: Biological control, *Globodera pallida*, plant nematodes, *Pleurotus ostreatus*, potato.

INTRODUCCIÓN

Globodera pallida es un nematodo parásito de plantas de la familia Solanaceae. Es un endoparásito sedentario con notable dimorfismo sexual. Su principal hospedero es la papa y las hembras forman quistes en las raíces, lo que afecta al crecimiento de la planta y la producción de tubérculos. Más del 10 % de la producción mundial de papa se pierde cada año debido a la infestación por nematodos fitoparásitos (López Torres 2013). En el Ecuador *Globodera* ha llegado a generar pérdidas de hasta el 30 % en el rendimiento del cultivo (Revelo 2003). El control de nematodos, en general, es complicado dado que los agroquímicos deben llegar desde el suelo al sistema radicular de las plantas. Los nematodos causan daños en las raíces lo que impide la absorción de pesticidas sistémicos, y estos productos solamente reducen mas no eliminan las poblaciones del patógeno, lo que obliga al agricultor a realizar varias aplicaciones (Sierra 2014); además estos químicos son considerados compuestos tóxicos (Huang et al. 2015). Es por esto que el interés científico se ha centrado en el desarrollo de alternativas de control más amigables con el medio ambiente y con la salud de las personas, como es el control biológico.

Los hongos nematófagos, incluyendo *Pleurotus ostreatus*, pueden parasitar directamente a los nematodos a través de sus hifas, y/o secretar metabolitos y enzimas con efectos que comprometen su viabilidad (Regaieg et al. 2010). Se ha reportado más de 200 moléculas con actividad nematicida, y 23 especies de *Pleurotus* presentan esta actividad (Li y Zhang 2014).

Dada la necesidad de contar con una estrategia de manejo integrado de plagas amigables con la agricultura sostenible y con la salud humana, esta investigación buscó determinar la acción del micelio y del filtrado de cultivos de *P. ostreatus* sobre larvas libres J2 de *G. pallida in vitro*, y establecer si existen diferencias significativas entre la actividad nematicida y nematostática del micelio y del filtrado de *P. ostreatus*, frente a larvas J2 de *G. pallida*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Nematodos de *G. pallida* en forma de quistes fueron expuestos a extractos de raíz de papa para inducir la liberación de larvas J2, según el método descrito por Arntzen et al. 1993. El extracto de papa se obtuvo mediante la saturación del suelo estéril con agua destilada en macetas con plantas de papa variedad Leona Negra. El líquido obtenido

fue recirculado tres veces y filtrado por papel filtro para eliminar partículas de suelo. El extracto se almacenó en refrigeración a 4 °C para su futuro uso (Farrer y Phillips 1983).

Para determinar el efecto de las hifas, un disco de 5 mm de diámetro del hongo *P. ostreatus* previamente reactivado en medio con agar extracto de malta (MEA), fue colocado al centro de placas de cultivo celular Costar de seis pocillos conteniendo agar agua. Se incubaron las cajas a 27°C durante cinco días, y una vez colonizado el medio se inoculó con 1 ml de solución con un contenido de 25 larvas activas J2 por ml, previamente tratadas con una solución de estreptomycin al 5 % (Heydari et al. 2006; Palizi et al. 2009; Sierra 2014). La viabilidad de las larvas fue evaluada acorde a su motilidad y presencia/ ausencia de hifas alrededor del nematodo cada 24, 48 y 72 horas post-inoculación (hpi). Se realizaron comparaciones de los resultados mediante ANOVA de una vía con seis repeticiones.

Para determinar el efecto del filtrado, se colocó en placas de cultivo celular Costar de seis pocillos, 2 ml del filtrado del caldo de cultivo Sabouraud de *P. ostreatus* de cada concentración (0, 50, 75 y 100 %) con 1 ml de solución con 25 larvas activas J2/ml. Las placas se mantuvieron dentro de una incubadora a 19-20 °C, y se analizó la actividad a las 8, 12 y 24 hpi (Meyer et al. 2004). A cada filtrado se añadió una solución de 1 % de antibiótico-antimicótico Gibco® (10,000 unidades/mL penicilina, 10,000 µg/mL estreptomycin, and 25 µg/mL de anfotericina B) previo a su uso (Nayar et al., 1991). Se utilizó NaOH como indicador de viabilidad. Los datos se analizaron mediante un diseño completamente al azar (DCA) en arreglo factorial 4 x 3 con seis repeticiones.

Para establecer si existieron diferencias significativas entre los efectos del micelio y filtrado se realizó una prueba de t de Student al 95 % entre el número de nematodos muertos del tratamiento 24 hpi hifas y el tratamiento 24 hpi concentración 100 % filtrado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de las Hifas. - Hubo crecimiento direccionado de hifas de *P. ostreatus* hacia las larvas a las 24 horas de exposición. Se observó penetración del hongo por orificios corporales del nematodo, y hubo la presencia de secreciones en forma de gotas en los extremos de las hifas (Fig. 1A- B). A las 48 hpi el 53,7 % de las larvas estaban colonizadas por el hongo, y a las 72 hpi el 80,3 %

se encontraban totalmente cubiertas por micelio (Figura 1A y B). Se observó, también, restos de cuerpos de nematodos digeridos por el hongo. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Heydari et al. 2006 y Palizi et al. 2009. El tratamiento con mayor número de nematodos inmóviles (34 %) fue el de 24 hpi, y luego este porcentaje se redujo ya que las hifas iniciaron el proceso de colonización y digestión (Aguilar Marcelino et al. 2017). El ANOVA indicó diferencias altamente significativas entre tratamientos tanto para la actividad nematocida como para la nematostática (Tabla 1).

Desde la primera observación en el ensayo (24 h), se identificó la presencia de pequeñas gotas en los extremos de las hifas de *P. ostreatus*. Se notó que estas secreciones fueron más frecuentes en los extremos de hifas en las porciones más antiguas del micelio. Kwok et al. 1992 identificaron secreciones de *P. ostreatus* como ácido trans-2-decenodioico. Cuando los nematodos entran en contacto con estas secreciones tóxicas, sufren parálisis y lisis de su cutícula. Las secreciones intracelulares una vez expuestas al medio externo estimulan el crecimiento de hifas en dirección a los nematodos.

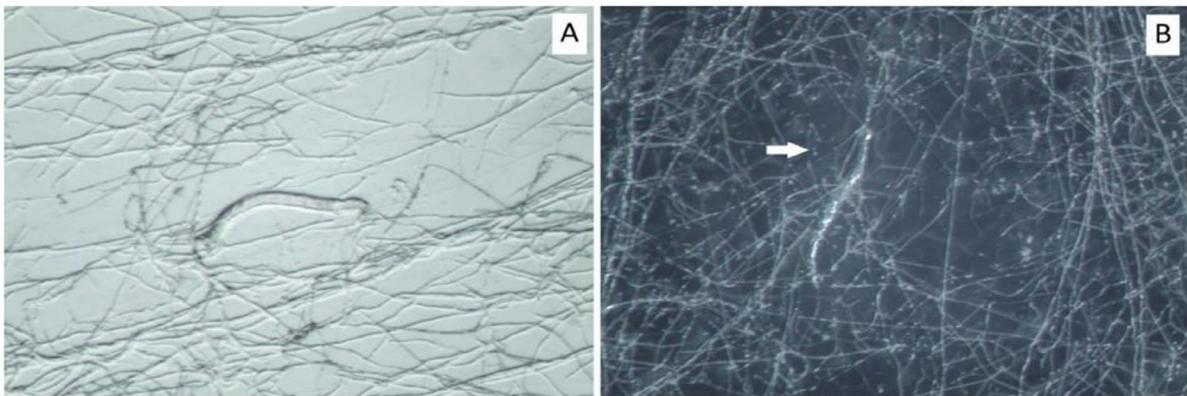


Figura 1. Hifas de *Pleurotus ostreatus* sobre larvas J2 de *Globodera pallida*. A) Hifas penetrando el orificio anterior y posterior de la larva. B) Observación de gotas secretadas por hifas de *P. ostreatus* (flecha) en presencia de una larva J2.

Tabla 1. ANOVA de resultados de la actividad nematocida (A) y nematostática (B) de hifas de *Pleurotus ostreatus* sobre larvas J2 de *Globodera pallida*.

A	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1 637,805	5	327.561	152.313	0,000
Dentro de grupos	62.367	29	2.151		
Total	1 700,171	34			
B	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	157.376	5	31.475	20.667	0,000
Dentro de grupos	44.167	29	1.523		
Total	201.543	34			

Efecto de los Filtrados. - Se observó que los filtrados del caldo de cultivo de *P. ostreatus*, en todas sus concentraciones, exhibieron un efecto nematocida y nematostático en las larvas J2 de *G. pallida*. Se encontró que al adicionar 1 % NaOH al medio, los nematodos que se encontraban paralizados retomaban la movilidad, lo que no se observó en los nematodos considerados muertos los cuales permanecían como en línea recta, sin movimiento (Figura 2A-C).

El tratamiento con concentración del filtrado de 100 % y 24 hpi obtuvo la mayor tasa de mortalidad con 41,6 %. Este resultado con *Globodera* es considerado relativamente bajo, ya que en otras investigaciones la actividad nematocida de los

filtrados del caldo de cultivo de *P. ostreatus* sobre larvas J2 de *Meloidogyne javanica* y *Heterodera schachtii* fue del 100 % y el 97 % respectivamente, a las 24 h de exposición (Heydari et al. 2006, Palizi et al. 2009).

En cuanto a la actividad nematostática, no existió relación entre el porcentaje de J2 inmóviles, el tiempo de exposición y la concentración del filtrado; sin embargo, el tratamiento 100 % - 8 hpi fue el que exhibió mayor porcentaje de nematodos inmóviles (65,2%). Esto sugiere que el efecto nematostático del filtrado proveniente del cultivo de *P. ostreatus* tiene un pico de actividad a las 8 h y se mantiene durante las primeras 24 h de exposición (Palizi et al. 2009) (Figura 3A y B).



Figura 2. Efecto del filtrado de caldo de cultivo de *Pleurotus ostreatus* sobre larvas J2 de *Globodera pallida*. A) Forma corporal recta de nemátodos inmobilizados por filtrados del cultivo expuestos durante 10 segundos a una solución 1 % NaOH. B) Imagen del mismo campo óptico de nemátodos inmóviles expuestos durante un minuto a una solución 1 % NaOH. C) Imagen del mismo campo óptico de nemátodos inmóviles expuestos durante tres minutos a una solución de 1 % NaOH, se observa como retoman su movimiento a medida que aumenta el tiempo de exposición al NaOH, la flecha indica una larva muerta.

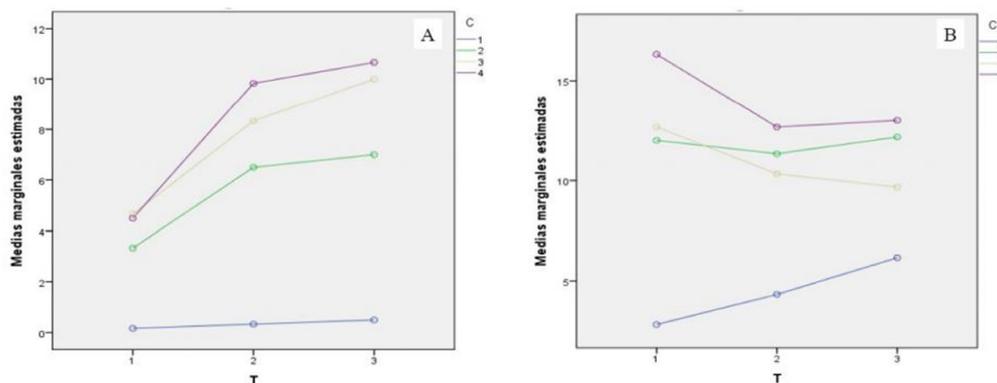


Figura 3. Efecto nematocida (A) y nematostático (B) de filtrados del caldo de cultivo de *Pleurotus ostreatus* sobre larvas J2 de *Globodera pallida* luego de ocho, 12 y 24 horas de exposición (T 1-3) a concentraciones 0, 50, 75, 100 % (C 1-4). Medias marginales estimadas A y B: promedio de nemátodos muertos / tiempo.2.

El NaOH permitió determinar que solamente aquellos nematodos que continuaron presentando una forma corporal recta después de adicionar este indicador químico, debían ser considerados muertos (Figura 2C). La reacción se explica debido al aumento en el pH del medio lo que desencadena la activación de bombas de transporte activo en los órganos quimiorreceptores de nematodos (Xiang y Lawrence 2016). Esta es una técnica fácil y rápida para determinar con mayor certeza los efectos de los filtrados de caldo de cultivo sobre la viabilidad de los nematodos. Se observó que nematodos que estaban solamente inmovilizados, reaccionaban al cambio en el pH del medio alterando su forma corporal de apariencia recta a curva o en forma de gancho. Es posible que los resultados obtenidos por Heydari et al. 2006 y Palizi et al. 2009 mencionados anteriormente, donde los porcentajes de mortalidad reportados fueron mucho mayores a los obtenidos en este estudio, pero al no haber utilizado indicadores como el NaOH, se podría asumir que, algunos de estos nematodos estaban únicamente paralizados y no muertos.

La prueba t de Student determinó que existen diferencias significativas entre los tratamientos hifas y filtrados concentración 100% de *P. ostreatus* a las 24 h de exposición, siendo el tratamiento 24 h concentración 100 % filtrado el que presentó una mayor toxicidad contra *G. pallida* (Tabla 2).

Los datos obtenidos en esta investigación soportan la hipótesis de que *P. ostreatus*, tanto hifas como filtrados del caldo de cultivo, presentan actividad nematocida y nematostática contra juveniles J2 de *G. pallida*. Contrario a lo que se creía anteriormente, los hongos cultivados en medio líquido presentan metabolitos con actividad no solo nematostática, sino también nematocida.

Se cree que exotoxinas provenientes de *P. ostreatus*, las cuales son secretadas hacia el medio, son las responsables del efecto nematocida. Es necesario identificar los componentes de los filtrados de caldos de cultivo de *P. ostreatus* con el fin de aislar sustancias nematocidas.

Tabla 2. Prueba de t de Student entre los tratamientos 24 horas concentración 100 % filtrado y 24 horas hifas de *Pleurotus ostreatus* sobre larvas J2 de *Globodera pallida*.

		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		Prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
								Inferior	Superior	
J2 muertos	Se asumen varianzas iguales	0,862	0,38	4.404	10	0,001	-5	1.135	-7,53	-2,47
	No se asumen varianzas iguales			4.404	8.538	0,002	-5	1.135	-7,59	-2,41

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestro agradecimiento a Katerine Orbe y Pablo Llumiquinga del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Departamento de Protección Vegetal, por proporcionar los nematodos utilizados en los ensayos. Este trabajo fue financiado por la Pontificia Universidad Católica del Ecuador como parte de los fondos de investigación N13394 asignados al Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arntzen FK, Visser JHM, Hoogendoorn, J. 1993.

Hatching of *Globodera pallida* juveniles by diffusate of potato genotypes, differing in tolerance to *G. pallida*. *Annals of Applied Biology*. 123(1):83-91.

Aguilar Marcelino L, Sánchez J, Mendoza de Gíves P. 2017. Uso biotecnológico de productos obtenidos a partir de *Pleurotus* spp. en el control de nematodos parásitos de importancia pecuaria. *La biología, el cultivo y las propiedades nutricionales y medicinales de las setas Pleurotus spp.* (1):297-309.

Degenkolb T, Vilcinskas A. 2016. Metabolites

- from nematophagous fungi and nematicidal natural products from fungi as alternatives for biological control. Part II: metabolites from nematophagous basidiomycetes and non-nematophagous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 100(9):3813–3824.
- Farrer LA, Phillips MS. 1983. In vitro hatching of *Globodera pallida* in response to *Solanum vernei* and *S. tuberosum* × *S. vernei* hybrids. *Revue de nématologie*. 6(2):165-169.
- Genier HA, De Freitas Soares EF, De Queiroz, JH, De Souza Gouveia A, Araújo JV, Braga FR, Kasuya MCM. 2015. Activity of the fungus *Pleurotus ostreatus* and of its proteases on *Panagrellus* sp. larvae. *African Journal of Biotechnology*. 14(17):1496–1503.
- Heydari R, Pourjam E, Mohammadi Goltapeh E. 2006. Antagonistic effect of some species of *Pleurotus* on the root-knot Nematode, *Meloidogyne javanica* in vitro. *Plant Pathology Journal*. 5(2):173–177.
- Huang X, Zhang K, Yu Z, Li G. 2015. Microbial control of phytopathogenic nematodes. En B. Lugtenberg (Ed.). *Principles of Plant-Microbe Interactions*. pp. 155–164.
- Kwok OCH, Plattner R, Weisleder D, Wicklow DT. 1992. A nematicidal toxin from *Pleurotus ostreatus* NRRL 3526. *Journal of chemical ecology*, 18(2):127-136.
- Li G, Zhang K. 2014. Nematode-toxic fungi and their nematicidal metabolites. In *Nematode-Trapping Fungi*; Zhang, K., Hyde, K., Eds. Dordrecht, The Netherlands. pp 313–375.
- López Torres ME. 2013. Evaluación de genes de resistencia a virus y nematodos mediante marcadores moleculares en *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* del banco de germoplasma de papas de la Universidad Austral de Chile (No. 635.217/L864) Tesis de maestría.
- Meyer SL, Huettel RN, Liu XZ, Humber RA, Juba J, Nitao JK. 2004. Activity of fungal culture filtrates against soybean cyst nematode and root-knot nematode egg hatch and juvenile motility. *Nematology*, 6(1):23-32.
- Nayar JK, Crowder CG, Knight JW. 1991. In vitro development of *Brugia pahangi* and *Brugia malayi* in cultured mosquito thoraces. *Acta tropica*. 48(3):173-184.
- Palizi P, Goltapeh EM, Pourjam E, Safaie N. 2009. Potential of oyster mushrooms for the biocontrol of sugar beet nematode (*Heterodera schachtii*). *Journal of Plant Protection Research*. 49(1):27–33.
- Regaieg H, Ciancio A, Raouani NH, 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 J. Microbiol. Biotechnol*. 26:2285–2289.
- Revelo J. 2003. Manejo integrado del nematodo quiste de la papa (*G. pallida*) en Ecuador. XXXV Reunión Anual de la Organización de Nematólogos de los Trópicos Americanos. 27-28. Guayaquil.
- Sierra J. 2014. Evaluación de la acción nematicida in vitro e in vivo de especies de *Pleurotus* spp., sobre los nematodos *Meloidogyne* spp. y *Radopholus* spp. asociados a los cultivos de tomate y plátano. Universidad Nacional de Colombia, Colombia. Tesis de Maestría.
- Xiang N, Lawrence KS. 2016. Optimization of in vitro techniques for distinguishing between live and dead second stage juveniles of *Heterodera glycines* and *Meloidogyne incognita*. *PloSone*. 11(5):e0154818.