

Interacción tritrófica entre hongos endófitos, *Meloidogyne* spp. y tomate.

Tritrophic interaction between endophytic fungi, *Meloidogyne* spp. and tomato.

Hugo Néstor Valiente Raidán^{1*}

¹Instituto Paraguayo de Tecnología Agraria (IPTA) Ruta II Mcal. Estigarribia, km 48,5. Caacupé – Paraguay.

*Autor para correspondencia (flamenkhugo@gmail.com)

Recibido: 09/11/2019 Aceptado: 19/12/2019

RESUMEN

El tomate es uno de los rubros hortícolas más importantes en el Paraguay y principal hospedero del nematodo formador de agallas *Meloidogyne* spp. La falta de alternativas de control eficaces y seguras contra este nematodo es una constante para los productores. Los ascomicetos mitospóricos pueden contribuir en la protección de su hospedero contra factores bióticos y abióticos, además, son fáciles de producir a gran escala y formular. Se evaluó la extensión de la colonización de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium brunneum* en raíces de tomate T-IAN V2 (Pytã guasú), y su efecto sobre la población de *Meloidogyne* spp. Para el tratamiento de semillas, aplicación en la rizosfera y la combinación de los citados tratamientos, se utilizó una concentración de 1×10^8 conidios ml^{-1} en solución acuosa estéril de Tween 80 al 0,1%. El nivel de infestación inicial con huevos de *Meloidogyne* spp. fue de 500 huevos por planta. Se evaluó altura de planta y longitud de raíz, peso fresco de parte aérea y raíz, porcentaje de colonización de hongos endófitos en las raíces, y población del nematodo formador de agallas (número de agallas, masa de huevos y huevos) a los 30 días después de la inoculación con huevos de nematodos. Se efectuaron cortes histológicos en las raíces para observar la interacción tritrófica hongo/planta/nematodo. Los hongos *B. bassiana* y *M. brunneum* colonizaron las raíces de tomate, incrementaron la biomasa, pero no fueron eficaces en la reducción de la población de *Meloidogyne* spp. No se observó interacción tritrófica en los cortes histológicos.

Palabras clave: *Beauveria bassiana*, *Meloidogyne*, *Metarhizium brunneum*, *Solanum lycopersicum*, Control biológico.

ABSTRACT

Tomato is one of the most important horticultural crops cultivated in Paraguay and main host of the root-knot nematode *Meloidogyne* spp. The lack of frequent and safe control alternatives against this nematode is a constant for farmers. Mitosporic ascomycetes can contribute to the protection of their host against biotic and abiotic factors, and they are easy to produce on a large scale and formulate. The extent of colonization of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium brunneum* in tomato T-IAN V2 (Pytã guasú) roots was evaluated, and its effect on the population of *Meloidogyne* spp. for the treatment of seeds, application in the rhizosphere and the combination of the mentioned treatments, a concentration of 1×10^8 conidia ml^{-1} in sterile aqueous solution of 0.1% Tween 80 was used. The level of initial infestation with *Meloidogyne* spp. was 500 eggs per plant. Plant height and root length, fresh weight of aerial part and root, percentage of colonization of endophyte fungi in the roots, and population of the root-knot nematode (number of galls, egg mass and eggs) at 30 days were evaluated after inoculation with nematode eggs. Histological sections were made in the roots to observe the tritrophic fungus/plant/nematode interaction. Fungi *B. bassiana* and *M. brunneum* colonized tomato roots, increased biomass, but were not effective in reducing the population of *Meloidogyne* spp. No tritrophic interaction was observed in histological sections.

Key words: *Beauveria bassiana*, *Meloidogyne*, *Metarhizium brunneum*, *Solanum lycopersicum*, Biological control.

INTRODUCCIÓN

La producción intensiva del tomate (*Solanum lycopersicum* L.), tiene como principal limitante en su producción la presencia de insectos plagas, enfermedades y nematodos. El uso indiscriminado de productos químicos para reducir los daños causados por las mencionadas limitantes, producen organismos resistentes a sus compuestos activos, causando daños tanto al ambiente como a la salud humana (De Almeida *et al.* 2012). Los nematodos formadores de agallas, son patógenos con un amplio rango de huéspedes que incluye la mayoría de los cultivos de importancia económica global (Jones *et al.* 2013). Puesto que son de difícil control, es necesario prácticas dirigidas a un manejo integrado (Ferraz *et al.* 2010). De acuerdo con Charchar *et al.* (2003) el cultivo del tomate se destaca por ser uno de los principales hospederos de *Meloidogyne*, donde a lo largo de los años se han observado grandes pérdidas causadas por éste fitonematodo.

Los suelos supresivos a nematodos son ejemplos de control biológico natural que incluyen antagonistas de nematodos con potencial para su uso en el manejo de dichos patógenos vegetales (Escudero y Lopez-Llorca 2014). Estudios recientes demuestran la enorme capacidad que tienen los hongos endófitos para producir compuestos activos que le confieren protección a su hospedera contra el ataque de patógenos y herbívoros (Owen *et al.* 2016, Resquin-Romero *et al.* 2016), constituyendo una nueva vía para la obtención de diversos precursores o moléculas novedosas de utilidad en la agricultura y en la medicina (Sánchez-Fernández *et al.* 2013, Rios-Moreno *et al.* 2016, Lozano-Tovar *et al.* 2015).

Se ha constatado que los HE poseen la capacidad de secretar compuestos tóxicos durante el ciclo de infección (Sánchez-Fernández *et al.* 2013; Resquin-Romero *et al.* 2016). Estos compuestos pueden tener distintas propiedades bioactivas como son insecticida, acaricida, nematicida, antibiótica, antifúngica, citotóxica, mutagénica o ser factores de virulencia de estos agentes de control (Quesada-Moraga *et al.* 2014), inducir efectos alelopáticos de su hospedera a través de la producción de metabolitos secundarios o aleloquímicos, también producir precursores o metabolitos secundarios con actividad biológica, cuya síntesis se atribuye a la planta (Sánchez-Fernández *et al.* 2013).

La destruxina A (dtx A), uno de los principales metabolitos secundarios producidos por el género *Metarhizium*, es importante para la actividad insecticida, la citotoxicidad y para el daño y la supresión de la inmunidad innata de los insectos (Ríos-Moreno *et al.* 2016). La destruxina puede regular

positivamente varias proteínas de estrés como caspasas en invertebrados, cuya activación desencadena la apoptosis (Garrido-Jurado *et al.* 2017).

Los objetivos específicos de este trabajo son; evaluar la formación de agallas y la población (número de masa de huevos y huevos) de la generación I de *Meloidogyne* spp. en las raíces del cultivo temporalmente colonizadas por los hongos, determinar la extensión de la colonización endófito en raíces de tomate, y efectuar cortes histológicos para analizar la interacción HE/tomate/nematodo formador de agallas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diagnóstico y localización: Las muestras de raíces, fueron recolectadas de una parcela destinada a multiplicación de inóculo, cultivada con lupino blanco (*Lupinus albus* L.), del Centro de Investigación "Hernando Bertoni" (CIHB), ubicado sobre Ruta II, km 48.5, en el municipio de Caacupé, departamento Cordillera, Paraguay. La instalación y evaluación del experimento, se llevó a cabo en el Laboratorio de Nematología del CIHB, en el Área de Protección Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Asunción, y en el Departamento de Fitopatología del CIHB, en el período de 15 de febrero al 15 de julio de 2019.

Extracción de adultos hembras y cría de *Meloidogyne* sp: Se utilizaron huevos de hembras adultas de *Meloidogyne* spp. y agallas de plantas de tomate. Las hembras adultas se obtuvieron de raíces con agallas, utilizando la metodología de Carneiro *et al.* (2004). El inóculo del nematodo formador de agallas se crió en raíces de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L. 'Santa Clara'), durante 3 meses en condiciones de invernadero (25-30°C), sin control de fotoperiodo. Para la extracción de Especies de hongos endófitos (HE) y suspensiones: Se utilizaron las dos especies de hongos endófitos, (*B. bassiana* y *M. brunneum*, Ascomycetes, Hypocreales), de la colección de la micoteca del Área de Protección Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Asunción. La aplicación y manejo de los tratamientos se realizaron según la metodología utilizada por Resquin-Romero *et al.* (2016). Cada especie se sub-cultivó en placas de Petri (Citotest, China) sobre medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA), en una proporción de 4-20-15 g l⁻¹ de agua destilada, adicionando antibiótico, 500 mg l⁻¹ de sulfato de estreptomycin (Laboratorios ENCO, Argentina) durante 15 días a 25°C en la oscuridad. Cada placa de Petri, se selló con Parafilm (American National Can, Chicago, IL.). Se prepararon suspensiones de conidios raspando conidios de cada especie cultivada, en una solución acuosa estéril de

Tween 80 al 0,1% y se filtraron a través de un trozo de estopilla. Las suspensiones de conidios a ser utilizadas se ajustaron diluyendo los conidios con Tween 80 al 0,1% hasta una concentración final de $1,0 \times 10^8$ conidios ml^{-1} usando un hemocitómetro (Cámara de Neubauer BLAUBRAND®, Alemania).

Proceso de desinfección, inoculación con HE y siembra de semillas: Las semillas de tomate (10 g) T-IAN V2 (Pytã guasú) de crecimiento determinado, fueron desinfectadas superficialmente. Para lograr esto, las semillas se sumergieron en etanol al 70% (v / v) durante 30 segundos, seguido de NaOCl al 1% durante 1 min y se aclararon con agua esterilizada tres veces. Finalmente, se sumergieron nuevamente en etanol al 70% (v / v) durante 30 segundos y se secaron bajo flujo de aire estéril por 2 h. Por último, agua de enjuague se colocó para evaluar la eficacia del procedimiento de desinfección de la superficie. Luego, se inocularon las semillas bajo campana de aislación con una suspensión de conidios a una concentración de $1,0 \times 10^8$ conidios ml^{-1} de cada especie (*B. bassiana* y *M. brunneum*) por separado. Posteriormente se dejó reposar por 1 h y luego se sembró. Las semillas se transfirieron a macetas de plástico 3000 cm^3 de capacidad. Cada maceta se llenó con una mezcla (1:1) (60% de arena, 30% de arcilla, 10% de limo, pH 6.0, autoclavada), más composta a base de Hortec®. Según la metodología desarrollada por Resquin-Romero *et al.* (2016), el sustrato se esterilizó en una autoclave durante 45 min a 121°C durante tres veces con intervalos de 24 h asignados entre cada proceso de esterilización, y se dejó enfriar durante 24 h antes de la siembra. Se sembraron dos semillas por maceta y se mantuvo a una temperatura de $27 \pm 3^\circ\text{C}$, 13 h de luz solar (intensidad de luz de 700 lx) y 11 h de oscuridad.

Inoculación en el área de la rizosfera de la planta: Una

vez que las plantas alcanzaron una altura de 15 a 20 cm, se pipetearon las suspensiones con una concentración de $1,0 \times 10^8$ conidios ml^{-1} de cada especie (*B. bassiana* y *M. brunneum*) por separado, en hoyos de 2 a 3 cm en la zona de la rizosfera.

Combinación de inoculación en semillas y rizosfera: Se utilizaron nuevamente ambas especies de HE y 10 g de semillas de tomate T-IAN V2 (Pytã guasú) y se procedió como se describió anteriormente, una vez que dichas plantas alcanzaron una altura de 15 a 20 cm, se aplicaron las suspensiones fúngicas en la zona de la rizosfera.

Proceso de inoculación con huevos de *Meloidogyne* sp: Cuando las plántulas, que fueron inoculadas con HE previamente, alcanzaron a tener 15 a 20 cm de altura, sus raíces fueron inoculadas con 500 huevos del nematodo de las agallas. Éstos fueron pipeteados con una suspensión de 1 ml y colocados en dos hoyos de 2 a 3 cm (0,5 ml en cada hoyo) en el suelo alrededor de la base del tallo. Las plantas inoculadas se dispusieron en un diseño completamente aleatorio con 8 tratamientos y 20 repeticiones por tratamiento. Las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero a 25-30°C, se regaron durante un mes.

Diseño de tratamientos y total de plantas a utilizar: El experimento fue dispuesto en un diseño completamente aleatorio con ocho tratamientos y 20 repeticiones por cada tratamiento, siendo cada planta una repetición, como se detalla en la tabla 1.

Variables evaluadas: Las variables evaluadas fueron: a) la formación de agallas y la población (número de masa de huevos, huevos) de nematodos en las raíces, b) la colonización de raíces por hongos entomopatógenos, y c) la interacción tritrófica a través de cortes histológicos.

Tabla 1. Distribución de los tratamientos y total de plantas utilizadas durante el estudio.

Concepto	Tratamientos		Plantas inoculadas
			30 DDIHN
<i>Beauveria bassiana</i>	BbS	Inoculación semillas	20
	BbR	Inoculación rizosfera	20
	BbC	Combinación semillas-rizosfera	20
<i>Metarhizium brunneum</i>	MbS	Inoculación semillas	20
	MbR	Inoculación rizosfera	20
	MbC	Combinación semillas-rizosfera	20
Control	TwS	Control semilla con Tween 80 0,1%	20
	CA	Control absoluto	20
Total			160

Tanto para formación de agallas y población de nematodos en las raíces, como para colonización de raíces por hongos entomopatógenos, la evaluación de cada planta se realizó a los 30 días después de la inoculación

de huevos de nematodos (DDIHN). Para la evaluación se extrajo el sistema radicular de cada planta, se enjuagó bajo agua corriente, luego se midió la altura, longitud y el peso fresco de las plantas (Figura 1). Luego se cuantificó

el número de agallas, masa de huevos y huevos de las raíces de cada planta, utilizando un método de extracción modificado (Hussey y Barker 1973), como se ha descrito anteriormente, solo que para esta metodología se utilizó una solución de NaOCl al 1% por 1 minuto y la extracción se realizó con el uso de una licuadora y vertidas sobre filtros (de malla 60, 125 y 600 mesh) (Carneiro *et al.* 2004). Previa cuantificación del número total de agallas formadas en relación. La cuantificación de huevos de cada planta se realizó mediante un microscopio óptico (utilizando un sistema de Peters para cuantificación) realizándola en tres oportunidades o repeticiones. La cantidad de huevos se evaluó de un contenido (100 ml total) de volumen uniforme.

Las evaluaciones población de referencia (Rf) fueron calculados como $Rf = FP / IP$, donde FP = población final de huevos de nematodos y IP = población inicial de huevos de nematodos (IP = 500). El valor de Rf se transformó como $\log_{10}(x + 1)$, se sometió a un análisis de varianza y las medias se separaron usando la prueba de LSD ($P < 0,05$).

Consideración: Los tratamientos se consideraron resistentes cuando $Rf < 1$, mientras que aquellos para los que $Rf > 1$ se consideraron susceptibles (S), según Sasser *et al.* (1984).

Corte histológico de la interacción tritrófica: Se realizaron estudios histológicos de la penetración en: a) raíces colonizadas, b) raíces colonizadas y las agallas (raíz), c) nematodo (hembra) solo. Se seleccionaron al azar tres pequeñas secciones de raíces por tratamiento y se fijaron por inmersión en formalina tamponada neutra al 10% durante 24 horas y después se procesaron para su análisis histológico incrustando en parafina. Las muestras se cortaron a un espesor de 2 a 3 μm con un micrótopo, se tiñeron con Acido Periódico-Schiff (PAS) y se examinaron bajo un microscopio óptico. El procedimiento y los

cortes histológicos fueron realizados en el Departamento de Ciencias Patológicas de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Asunción con la colaboración de la Dra. Shyrley Paola Amarilla. La identificación de los diferentes tejidos se realizó de acuerdo con Landa *et al.* (2013) y Garrido-Jurado *et al.* (2016).

Transformación de datos para el análisis: Para el análisis de los resultados de la evaluación de formación de agallas y la población (número de masa de huevos, huevos) de nematodos en las raíces colonizadas por hongos entomopatógenos se transformaron en $\text{LOG}_{10}(x+1)$ y la fórmula $\text{Arcosin} = 180 * [\text{Arcosin}(\text{Mortalidad } 100^{-1}) > 0,5] \square^{-1}$ se utilizó para transformar los valores del porcentaje de colonización por los hongos entomopatógenos sobre las masas de huevos y el parasitismo de huevos. Se realizó un Análisis de Varianza (ANAVA) y para conocer si existen diferencias se utilizó la prueba de rangos múltiples de LSD (nivel de significación $p > 0,05$). Los análisis se realizaron mediante el paquete estadístico Statistix 10.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de formación de agallas y la población (número de masa de huevos, huevos) de nematodos en las raíces de tomate: Se detectaron diferencias significativas entre los parámetros de altura, longitud y peso fresco de parte aérea y raíces con *Beauveria bassiana*, respecto a los demás tratamientos, cuyos resultados se presentan en la Figura 1.

Cuando se comparó *B. bassiana* aplicada en la rizósfera, con los tratamientos de control Tween 80 en semilla (TwS) y el testigo absoluto (CA), el porcentaje de incremento en las citadas características agronómicas fue del 38,1% y 21,3% para altura de planta; 42,8% y 29,1% para longitud de raíz; del 92,5% y 57,4% para peso de raíz; y del 79,4% y 42,5% para el peso foliar, respectivamente.

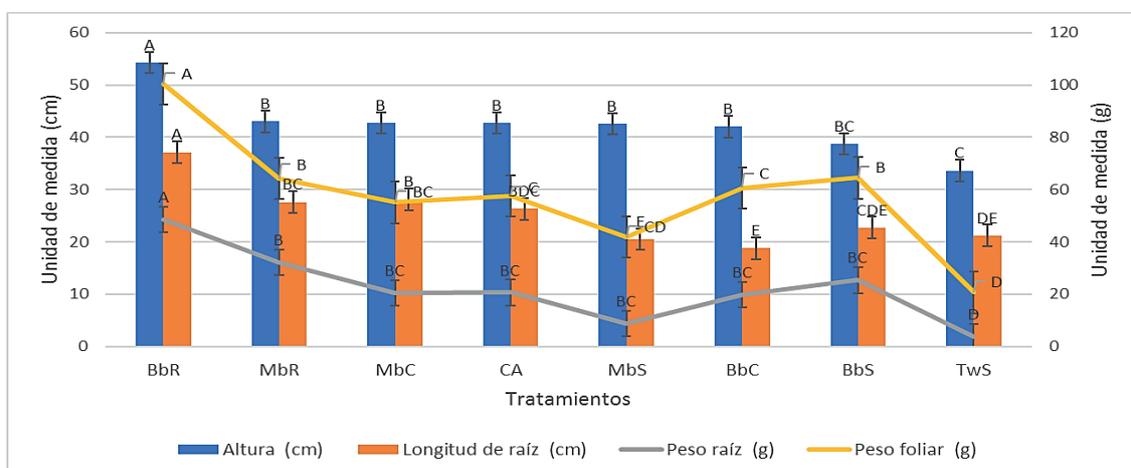


Figura 1. Valores de Medias (\pm SE) de altura, longitud de raíz y peso fresco de plantas de tomate para los 30 días. Las medias seguidas por la misma letra en las barras no difirieron significativamente según la comparación de contrastes en los modelos lineales generalizados ($P. 0.05$).

Un número creciente de estudios han demostrado últimamente la capacidad de varios entomopatógenos fúngicos para promover el crecimiento de las plantas después del establecimiento endofítico (Jaber y Ownley 2018). También se ha identificado a los ascomicetos patógenos como colonizadores de la rizosfera (Sasan y Bidochka 2012; Liao *et al.* 2014). Este trabajo demuestra que, en las cuatro variables agronómicas tenidas en cuenta, *B. bassiana* aplicada a la rizosfera, aportó un mayor incremento en la biomasa de toda la planta, en concordancia con (Jaber y Salem 2014) quienes demostraron que plantas de calabaza inoculadas con *B. bassiana*, no solo expresaron una incidencia y gravedad reducidas del virus del mosaico amarillo del calabacín (ZYMV, por sus siglas en inglés), sino que también aparecieron más vigorosas y se desarrollaron más rápido que las plantas de control no inoculadas. (Greenfield *et al.* 2016) encontraron diferencias en el éxito de la colonización y el crecimiento de plantas de mandioca tratadas con *B. bassiana* y *M. brunneum*. De manera similar, (Jaber y Enkerli 2016; Jaber y Araj 2018) informaron que la colonización endofítica por los entomopatógenos fúngicos (*B. bassiana* y *M. brunneum*) inoculados mejoró varios parámetros de crecimiento de plantas muestreadas. A diferencia del presente trabajo, los

autores recientemente mencionados, se centraron en el tratamiento de semillas en diferentes duraciones (2, 8 y 16 horas), concluyendo que el crecimiento de las plantas mejoró significativamente a medida que aumentó la duración del tratamiento de las semillas, independientemente de la cepa fúngica, datos que serían de mucha utilidad al tenerlos en cuenta para futuras investigaciones similares. (Raya-Díaz *et al.* 2017) observaron que *M. brunneum* en dosis bajas, no presenta gran efecto, sin embargo, en dosis altas (5×10^8 conidios ml^{-1}) aumentó la altura de la planta y la inflorescencia en girasol, aliviando también los síntomas de clorosis de Fe en plantas de sorgo. Considerando que la dosis utilizada en el presente experimento fue de 1×10^8 conidios ml^{-1} , estos datos podrían ser muy útiles para el planteamiento de dosis a ser utilizada en próximos experimentos.

Para las variables de número de agallas, masa de huevos y huevos, se seleccionaron los tratamientos que presentaron un mayor porcentaje de colonización por hongos endófitos (Figura 2) y se compararon con los tratamientos de control (Tween 80 en semillas y testigo absoluto). El presente experimento, presentó interacciones significativas para *M. brunneum* y *B. bassiana*, principalmente en el número de huevos, los resultados se presentan en el tabla 2.

Tabla 2. Número (Media \pm SE) de agallas, masa de huevos, huevos y población de referencia (Rf) de *Meloidogyne* spp. en raíces de tomate que presentaron mayor porcentaje de colonización por *Beauveria bassiana* (BbC) y *Metarhizium brunneum* (MbC) en combinación.

Trat.	30 DDIHN			
	Agallas ^{a,b} (unidad)	Masa de huevos ^{a,b} (Unidad)	Huevos ^{a,b} (Unidad)	RF ^{a,b,c}
MbC	1,86 \pm 0,14 A	2,17 \pm 0,15 A	0,27 \pm 0,02 A	0,90
BbC	1,67 \pm 0,13 AB	2,06 \pm 0,14 AB	0,26 \pm 0,01 A	0,84
TwS	1,68 \pm 0,03 AB	1,84 \pm 0,03 AB	0,14 \pm 0,01 B	0,38
CA	1,45 \pm 0,06 B	1,75 \pm 0,09 B	0,20 \pm 0,01 B	0,51

a El nivel inicial de infestación fue de 500 huevos de nematodos por tratamiento.

b Los números se refieren a la media de veinte repeticiones en cada prueba. Las medias seguidas por la misma letra en una columna (dentro de cada experimento) no difirieron significativamente según la comparación de contrastes en los modelos lineales generalizados (P. 0.05).

c Todos los tratamientos presentan $Rf > 1$, por tanto, son considerados resistentes (calculado $Rf = FP / IP$).

A pesar de que ambas especies de HE utilizadas en el presente experimento colonizaron las plantas, causando incluso un incremento en la biomasa, comparado con las plantas no inoculadas, ninguna de las mencionadas especies presentó efecto supresivo alguno sobre la población de nematodos, alcanzando los números más altos de infección con número de agallas, masa de huevos y huevos.

Mwaura *et al.* (2017) describieron que cuando se inoculó *B. bassiana* junto con *Ditylenchus destructor* o *Ditylenchus dipsaci*, se observó una mayor reproducción de los nematodos y daños en el

tubérculo, además, el peso del tubérculo se redujo significativamente cuando los nematodos estaban presentes junto con *B. bassiana*. Si bien los valores promedios de población de referencia (Rf) indican que todos los tratamientos son considerados resistentes ($Rf > 1$), se debe tener en cuenta que la evaluación se realizó a los 30 días, donde se estima que *Meloidogyne* apenas cumplió un primer ciclo de vida y los HE tuvieron el tiempo de colonizar e interactuar con la planta hospedera para ejercer mecanismos antagónicos contra el nematodo en nivel de infestación bajo (500 huevos ml^{-1}). El nivel de infección por el nematodo,

sugiere que evaluaciones posteriores fácilmente arrojarían valores de Rf mayores a 1, donde todos los tratamientos serían considerados susceptibles. La baja eficacia de algunas cepas fúngicas nematófagas contra los nematodos formadores de agallas en las raíces de tomate, en comparación con otros huéspedes, ya se ha informado (Stirling *et al.* 1979; Bourne *et al.* 1996). Aún queda mucho por conocer y entender sobre las formas de colonización, condiciones para el establecimiento y modo de acción de los hongos endófitos, así como también sobre las rutas por las cuales los nematodos manipulan a sus plantas hospederas, pero la dinámica del ecosistema del suelo dificulta el análisis de la importancia de los factores individuales y sus interacciones, y la mayoría de las investigaciones se han basado en el análisis *in vitro* de las características individuales (Perry *et al.* 2009). En un trabajo similar, pero con otras especies de hongos, Silva *et al.* (2017) sugirieron que los huevos dentro de la matriz gelatinosa pueden ser menos susceptibles que los huevos individuales a la infección por especies de hongos, y que el uso de hongos nematófagos como un enfoque independiente no sería aconsejable, pero podrían usarse como parte de un programa de manejo integrado para *M. enterolobii* en cultivos de tomate cuando la población de nematodos es baja. Se cree que los nematodos de los nudos de las raíces secretan, a través de la cutícula, enzimas antioxidantes pueden proteger al nematodo de la respuesta oxidativa del huésped a la infección del nematodo (Robertson *et al.* 2000; Prior *et al.* 2001; Jones *et al.* 2004). Huang *et al.* (2006) y Mitchum *et al.* (2008) indicaron

que los nematodos de nudo de raíz y de quiste han desarrollado estrategias de mimetismo de plantas para interferir con las vías de señalización del desarrollo de las células vegetales. De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, se sugiere el ajuste de las horas de inoculación de semillas y de las dosis en la suspensión de conidios de He, basados en los trabajos realizados por Jaber y Enkerli (2016); Raya-Díaz *et al.* (2017).

Para la colonización de raíces por HE en plantas de tomate (Figura 2), todos los tratamientos considerados para ambas especies de hongos utilizados en este trabajo, pudieron colonizar endofíticamente las raíces de plantas de tomate, resaltando los tratamientos en combinación inoculación en semillas y posterior aplicación del inóculo en la rizosfera, alcanzando los mayores valores de media de colonización.

En primer lugar, se apreció a BbC cuya media corresponde a un 38% de colonización, seguido en segundo lugar, por MbC con una media equivalente al 29% de colonización. Los demás tratamientos para ambas especies de HE, presentaron valores de media que oscilaron entre el 7% y el 12% de colonización. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Tefera y Vidal (2009); Quesada-Moraga *et al.* (2009); Gurulingappa *et al.* (2010); Biswas *et al.* (2012); Resquín-Romero *et al.* (2016); Garrido-Jurado *et al.* (2017); Jaber y Araj (2018) quienes reportaron la colonización endofítica exitosa de varias plantas usando diferentes métodos de inoculación tales como pulverización foliar, suelo empapado o aderezo de semillas.

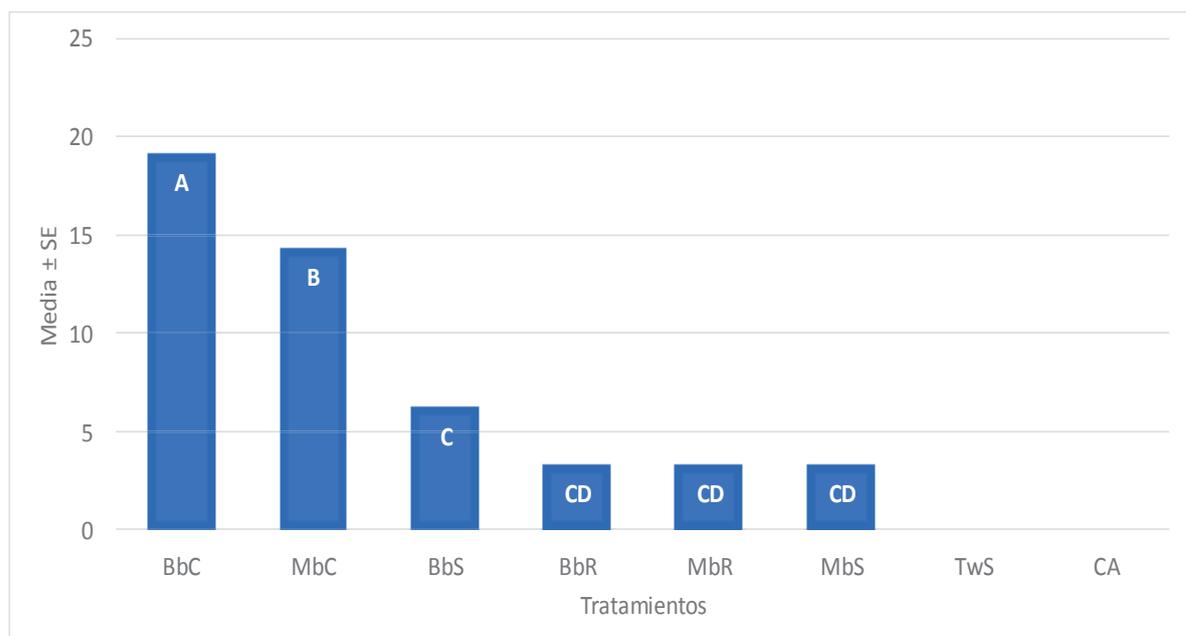


Figura 2. Valores de media (\pm SE) de colonización de raíces por *B. bassiana* y *M. brunneum*, para los 30 días. Las medias seguidas por la misma letra en las barras no difirieron significativamente según la comparación de contrastes en los modelos lineales generalizados (P. 0.05).

Resultados similares fueron obtenidos por Greenfield *et al.* (2016) quienes observaron que mediante inoculación en el área de la rizosfera resultó en la colonización endofítica de las raíces de mandioca por *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, destacando que los niveles de colonización de *M. anisopliae* se mantuvieron constantes de 7 a 49 días después de la inoculación (80%), sugiriendo que tiene mayor capacidad de persistir en el suelo. Jaber y Enkerli (2016) encontraron que el porcentaje de colonización de diferentes partes de la planta (raíz, hoja y tallo) muestreadas 14 y 28 días después de la inoculación aumentó a medida que la duración del tratamiento de la semilla también aumentó. Si bien en el presente experimento no se trabajó en la duración de la inoculación, podría establecerse una relación donde el mayor porcentaje de colonización y la repetición de la aplicación de los tratamientos en

semilla y posteriormente en la rizosfera podría equivaler a una dosis más alta de conidios, o un tratamiento de mayor duración en horas, estando de acuerdo con (Jaber y Ownley 2018; Raya-Díaz *et al.* 2017) quienes demostraron que el método de inoculación afecta la eficiencia de la colonización y las altas tasas de inóculo suelen ser óptimas para mejorar los niveles de colonización.

Corte histológico de la interacción tritrófica: En las Figuras 3, 4 y 5 se logra apreciar a las raíces de tomate infectadas, conteniendo en su interior a hembras adultas de *Meloidogyne* spp. La Figura 3 corresponde al testigo absoluto (CA), donde se observó a dos hembras adultas (a), intactas cumpliendo su ciclo de vida. Además, no se observó presencia alguna de otro microorganismo extraño a los considerados en cada tratamiento.



Figura 3. A. Corte transversal de dos nematodos en la raíz perteneciente al testigo absoluto (CA). Pared celular y celdas con estructura conservada. PAS 5X.

En las Figuras 4 y 5, se observó a la hembra adulta de *Meloidogyne* spp. sin ningún indicio de haber sido colonizada o alcanzada por ningún tipo de estructura fúngica de *B. bassiana*. Tampoco se logró observar la presencia de dichas estructuras fúngicas, en los tejidos de la raíz. Teniendo en cuenta que, según las pruebas realizadas, todos los tratamientos considerados para ambas especies de hongos utilizados en este trabajo, pudieron colonizar endofíticamente

las raíces de plantas de tomate, la ausencia de estructuras de HE en las imágenes presentadas, podría deberse a una situación azarosa de haber realizado el corte en zonas de la raíz donde no hubo colonización, ya que los valores no fueron superiores al 38% para *B. bassiana* ni al 29% para *M. brunneum*. No obstante, se considera que ninguna de las especies de HE en estudio, pudieron tener efecto alguno sobre *Meloidogyne* spp.

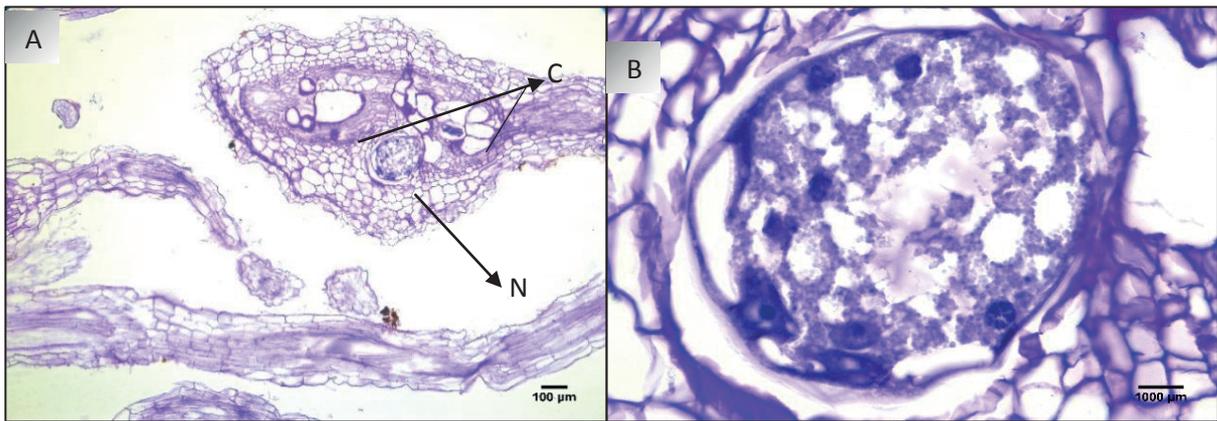


Figura 4. Corte histológico de raíz de tomate, perteneciente al tratamiento con *Beauveria bassiana*. A. Corte transversal de un nematodo en la raíz (N). Se identifica una cavidad con estructura comprimida de nematodo y otras cavidades sin contenido alguno (C). Pared celular y celdas con estructura conservada. PAS 5X. B. Corte transversal de un nematodo en la raíz. Se identifica su cutícula, cavidad celómica rellena por restos celulares conservados. PAS 40X.

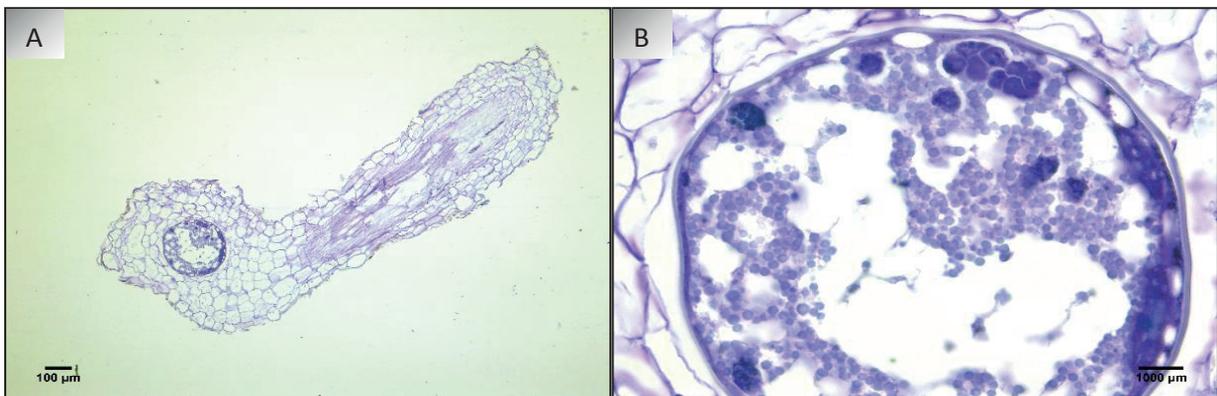


Figura 5. Corte histológico de raíz de tomate, perteneciente al tratamiento con *Metarhizium brunneum*. A. Corte transversal de un nematodo en la raíz (N). Pared celular y celdas con estructura conservada. PAS 5X. B. Corte transversal de un nematodo en la raíz. Se identifica su cutícula, cavidad celómica rellena por restos celulares conservados. PAS 40X.

CONCLUSIÓN

En las condiciones en que se desarrolló el presente trabajo, se concluye que:

La colonización de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium brunneum* incrementa la biomasa de plantas de tomate. *Beauveria bassiana* y *Metarhizium brunneum* no son eficaces en la reducción de la población de *Meloidogyne* spp.

AGRADECIMIENTOS

Al IPTA por brindarme la oportunidad y los recursos necesarios para realizar este curso de Maestría. A mi familia, por el apoyo y comprensión durante este período de formación. A la Dra. Gloria Resquín, a la Ing. Agr. Lidia Pedrozo, y al equipo del Laboratorio de Nematología del Centro de Investigación “Hernando Bertoni” por todo el soporte técnico y la guía científica. A todas aquellas personas que contribuyeron para la conclusión de este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Biswas, C; Dey, P; Satpathy, S; Satya, P. 2012. Establishment of the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* as a season long endophyte in jute (*Corchorus olitorius*) and its rapid detection using SCAR marker. *Biocontrol* 57, 565–571.
- Bourne, JM; Kerry, BR; De Leij, FAAM. 1996. The importance of the host plant on the interaction between root-knot nematodes *Meloidogyne* spp. and the nematophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium* Goddard. *Biocontrol Science and Technology* 6: 539–548.
- Carneiro, R; Randig, O; Sarah, J-L; Almeida, MR; Tigano, M. 2004. Identification and genetic diversity of *Meloidogyne* spp. (Tylenchida: Meloidogynidae) on coffee from Brazil, Central America and Hawaii. *Nematology* 6(2): 287-298.
- Charchar, JM; Gonzaga V; Giordano LB, Boiteux LS; Reis NVB, and Aragão FAS. 2003. Reação

- de cultivares de tomateiro à infecção por população mista de *Meloidogyne incognita*. Nematologia Brasileira 27: 49-54.
- De Almeida, F; Petter, F; Siqueira, VC; Neto, FA; Alves, U; Leite, MLT. 2012. Modos de preparo de extratos vegetais sobre *Meloidogyne javanica* no tomateiro. Nematropica 42: 9-15.
- Escudero, N; Lopez-Llorca, LV. 2014. Estudio de la interacción tritrófica: tomate, *Meloidogyne javanica* y *Pochonia chlamydosporia*. Sociedad Española de Fitopatología 87: 73-81.
- Ferraz, S; LG Freitas, EA. Lopes, CR; Dias-Arieira. 2010. Manejo sustentável de fitonematoides. Viçosa, MG: Editora UFV.
- Garrido-Jurado, I; Resquín-Romero, G; Amarilla, SP; Ríos-Moreno, A; Carrasco, L; Quesada-Moraga, E. 2017. Transient endophytic colonization of melon plants by entomopathogenic fungi after foliar application for the control of *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae). Journal of Pest Science 90(1): 319-330.
- Greenfield, M; Gómez-Jiménez, MI; Ortiz, V; Vega, FE; Kramer, M; Parsa, S. 2016. *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* endophytically colonize cassava roots following soil drench inoculation. Biological Control 95: 40-48.
- Gurulingappa, P; Sword, GA; Murdoch, G; McGee, PA. 2010. Colonization of crop plants by fungal entomopathogens and their effects on two insect pests when in planta. Biological Control 55(1): 34-41.
- Huang, G; Allen, R; Davis, EL; Baum, TJ; Hussey, RS. 2006. Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 103: 14302-14306.
- Hussey, RS; Barker, KR. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. Plant Disease Repr. 57: 1025-1028.
- Jaber, LR; Ownley, BH. 2018. Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant pathogens? Biological Control 116: 36-45.
- Jaber, LR; Araj, SE. 2018. Interactions among endophytic fungal entomopathogens (Ascomycota: Hypocreales), the green peach aphid *Myzus persicae* Sulzer (Homoptera: Aphididae), and the aphid endoparasitoid *Aphidius colemani* Viereck (Hymenoptera: Braconidae). Biological Control 116: 53-61.
- Jaber, LR; Enkerli, J. 2016. Effect of seed treatment duration on growth and colonization of Vicia faba by endophytic *Beauveria bassiana* and *Metarhizium brunneum*. Biological Control, 103: 187-195.
- Jaber, LR; Salem, NM. 2014. Endophytic colonisation of squash by the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) for managing zucchini yellow mosaic virus in cucurbits. Biocontrol Science and Technology Endophytic colonisation of squash by the fungal entomop. no. October.
- Jones, JT; Haegeman, A; Danchin, EGJ; Gaur, HS; Helder, J; Jones, MGK; Kikuchi, T; Manzanilla López, R; Palomares-Rius, JE; Wesemael, WML; Perry, RN. 2013. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. Molecular Plant Pathology 14 (9): 946-961.
- Jones, JT; Reavy, B; Smant, G; Prior, AE. 2004. Glutathione peroxidases of the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. Gene 324, 47-54.
- Landa, BB; López-Díaz, C; Jiménez-Fernández, D; Montes-Borrego, M; Muñoz-Ledesma, FJ; Ortiz-Urquiza, A; Quesada-Moraga, E. 2013. In-plant detection and monitorization of endophytic colonization by a *Beauveria bassiana* strain using a new-developed nested and quantitative PCR-based assay and confocal laser scanning microscopy. Journal of Invertebrate Pathology 114(2): 128-138.
- Liao, X; O'Brien, TR; Fang, W; St. Leger, RJ. 2014. The plant beneficial effects of *Metarhizium* species correlate with their association with roots. Applied Microbiology and Biotechnology 98(16): 7089-7096.
- Lozano-Tovar, MD; Garrido-Jurado, I; Lafont, F; Quesada-Moraga, E. 2015. Insecticidal activity of a destruxin-containing extract of *Metarhizium brunneum* Against *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) (En 10.1093/jee/tov041). Journal of Economic Entomology 108(2): 462-472.
- Mitchum, MG; Wang, X; Davis, EL. 2008. Diverse and conserved roles of CLE peptides. Current Opinion in Plant Biology 11, 75-81.
- Mwaura, P; Niere, B; Vidal, S. 2017. Application of an entomopathogenic fungus (*Beauveria bassiana*) increases potato nematodes reproduction and

- potato tubers damage caused by *Ditylenchus destructor* and *D. dipsaci*. *Biological Control* 115: 23-29.
- Perry, RN; Moens, M; Starr, JL. 2009. Root-knot nematodes. CAB International. London, UK. 488 p.
- Prior, A; Jones, JT; Blok, VC; Beauchamp, J; McDermott, L; Cooper, A; Kennedy, MW. 2001. A surface-associated retinol- and fatty acid-binding protein (Gp-FAR-1) from the potato cyst nematode *Globodera pallida*: lipid binding activities, structural analysis and expression pattern. *Biochemical Journal* 356: 387-394.
- Quesada-Moraga, E; López-Díaz, C; Beatriz Landa, B. 2014. The hidden habit of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: First Demonstration of Vertical Plant Transmission. *PLOS ONE* 9: e89278.
- Quesada-Moraga, E; Muñoz-Ledesma, FJ; Santiago-Álvarez, C. 2009. Systemic Protection of *Papaver somniferum* L. against *Iraella luteipes* (Hymenoptera: Cynipidae) by an endophytic strain of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). *Environmental Entomology* 38(3): 723-730.
- Raya-Díaz, S; Quesada-Moraga, E; Barrón, V; Del Campillo, MC; Sánchez-Rodríguez, AR. 2017. Redefining the dose of the entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum* (Ascomycota, Hypocreales) to increase Fe bioavailability and promote plant growth in calcareous and sandy soils. *Plant and Soil* no. June: 1-18.
- Resquín-Romero, G; Garrido-Jurado, I; Delso, C; Ríos-Moreno, A; Quesada-Moraga, E. 2016. Transient endophytic colonizations of plants improve the outcome of foliar applications of mycoinsecticides against chewing insects. *Journal of Invertebrate Pathology* 136: 23-31.
- Ríos-Moreno, A; Garrido-Jurado, I; Resquín-Romero, G; Arroyo-Manzanares, N; Arce, L; Quesada-Moraga, E. 2016. Destruxin A production by *Metarhizium brunneum* strains during transient endophytic colonisation of *Solanum tuberosum*. *Biocontrol Science and Technology* 26(11.2016).
- Robertson L; Robertson, WM; Sobczak, M; Helder, J; Tetaud, E; Ariyanayagam, MR; Ferguson, MA; Fairlamb, A. Jones, JT. 2000. Cloning, expression and functional characterisation of a peroxiredoxin from the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 111: 41-49.
- Sánchez-Fernández, ER; Lorena Sánchez-Ortiz, B; Monserrat Sandoval-Espinosa, YK; Ulloa-Benítez, Á; Armendáriz-Guillén, B; Claudia García-Méndez, M; Macías-Rubalcava, M. 2013. Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *Tip* 16(2): 132-146.
- Sasan, RK; Bidochka, MJ. 2012. The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. *American Journal of Botany* 99(1): 101-107.
- Sasser, JN; Carter, CC; Hartman, KM. 1984. Standardization of Host Suitability studies and reporting of resistance to root-knot nematodes. s.l., s.e., 7.
- Silva, S; Carneiro, R; Faria, M; Souza, D; G. Monnerat, R; Lopes, R. 2017. Evaluation of *Pochonia chlamydosporia* and *Purpureocillium lilacinum* for suppression of *Meloidogyne enterolobii* on tomato and banana. s.l., s.e., 49: 77-85.
- Stirling, GR; McKenry, MV; Mankau, R. 1979. Biological control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) on peach. *Phytopathology* 69: 806-809.
- Tefera, T; Vidal, S. 2009. Effect of inoculation method and plant growth medium on endophytic colonization of sorghum by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *BioControl* 54(5): 663-669.