



Efecto de *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* sobre huevos de *Meloidogyne* sp. en condiciones de laboratorio

Trichoderma atroviride, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* effect on *Meloidogyne* sp. eggs under laboratory conditions

Gicelly A. T. Mendoza¹, Juan H. Wilson², Juan C. Colina³

¹Tesista de la Escuela AP de Microbiología y Parasitología de la Universidad Nacional de Trujillo (UNT). Trujillo. Perú. ²Departamento de Microbiología y Parasitología. UNT. ³Exalumno de la Escuela AP de Microbiología y Parasitología. UNT.

RESUMEN

Se determinó el efecto de *Trichoderma atroviride*, *T. harzianum* y *T. viride* sobre huevos de *Meloidogyne* sp. en condiciones de laboratorio. Para ello, se trabajó con seis tratamientos (T), de los cuales tres fueron controles: T1, huevos de *Meloidogyne* sp. solos (control negativo); T2, huevos de *Meloidogyne* sp. con Oxamyl (control positivo) y T3, huevos de *Meloidogyne* sp. con *Pochonia chlamydosporia* (control positivo) y los otros tres experimentales: T4, huevos de *Meloidogyne* sp. con *T. atroviride*; T5, huevos de *Meloidogyne* sp. con *T. harzianum* y T6, huevos de *Meloidogyne* sp. con *T. viride*. A partir del cultivo puro de cada hongo, se preparó una suspensión de 10⁶ conidias/mL de cada hongo y una suspensión de 900 ppm de oxamyl, se inoculó 2 mL de cada suspensión en pocillos que contenían 1 mL de agua destilada estéril con aprox. 100 huevos de *Meloidogyne* sp. incubándose por 72 horas, con cuatro repeticiones por tratamiento. Se concluye que *T. atroviride*, *T. harzianum* y *T. viride* tienen un efecto negativo sobre la evolución de los huevos de *Meloidogyne* sp. en condiciones de laboratorio.

Palabras clave: *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride*, *Meloidogyne* sp., *Pochonia chlamydosporia*, Oxamyl.

ABSTRACT

Effect of *Trichoderma atroviride*, *T. harzianum*, and *T. viride* on *Meloidogyne* sp.-ova under laboratory conditions was determined. To do this, we worked with six treatments (T), of which three were controls: T1, *Meloidogyne* sp. alone (negative control); T2, *Meloidogyne* sp. with Oxamyl (positive control) and T3, *Meloidogyne* sp. with *Pochonia chlamydosporia* (positive control) and three experimental: T4, *Meloidogyne* sp. with *T. atroviride*; T5, *Meloidogyne* sp. with *T. harzianum* and T6, *Meloidogyne* sp. with *T. viride*. From the culture of each fungus was prepared a suspension of 10⁶ conidia/mL of each fungi suspension and 900 ppm of oxamyl, was inoculated into 2 mL of each suspension wells containing 1 mL of sterile distilled water at approx. 100 *Meloidogyne* sp. incubated for 72 hours, with four replicates per treatment. It was concluded that *T. atroviride*, *T. harzianum*, and *T. viride* have a negative effect on the development of eggs of *Meloidogyne* sp. under laboratory conditions.

Keywords: *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride*, *Meloidogyne* sp., *Pochonia chlamydosporia*, Oxamyl.



INTRODUCCIÓN

Las enfermedades de las plantas ocasionadas por hongos, bacterias, virus y nematodos¹, constituyen uno de los elementos limitantes para la producción de cualquier cultivo agrícola². Entre los nematodos fitoparásitos que reducen significativamente la producción agrícola se encuentran los formadores de nódulos del género *Meloidogyne* sp.³, causando pérdidas del 14 % de la producción agrícola mundial, lo cual representa un tercio de las pérdidas atribuidas a plagas y enfermedades. Por tal motivo, se considera como el nematodo más común y destructivo de plantas⁴.

El género *Meloidogyne* sp. integra varias especies importantes para la agricultura. Algunas de sus especies son cosmopolitas y por sus hábitos polífagos son considerados como los más peligrosos para las plantas por tener un amplio rango de hospederos, parasitando prácticamente cualquier tipo de cultivo^{5,6}. Entre las especies relacionadas con importantes pérdidas económicas se encuentran *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. hapla* y *M. arenaria*^{7,8,9}.

Las especies del género *Meloidogyne* sp. poseen tres etapas en su ciclo de vida: huevo, tres estadios larvales y adulto¹⁰. Las hembras producen aproximadamente 3000 huevos contenidos en una matriz proteica gelatinosa, los que son depositados sobre la superficie de la raíz, y son inoculo efectivo para iniciar la infección de la planta. Los juveniles sufren una primera muda dentro del huevo, pasando de primer estadio larval (J1) a segundo estadio larval (J2), y cuando las condiciones de humedad y temperatura son favorables las larvas del segundo estadio eclosionan del huevo¹¹. Las raíces de las plantas son parasitadas por el segundo estadio larval o juvenil infectivo de *Meloidogyne* sp.¹², completando su ciclo vital en 1 – 2 meses, dependiendo de factores ambientales, por lo tanto pueden tener varias generaciones durante un cultivo^{13, 14}.

Actualmente, el control químico es una de las medidas que más se utilizan para minimizar los daños causados por *Meloidogyne* sp.¹⁵. Sin embargo, una de sus principales limitaciones de uso es que contaminan el manto freático lo cual puede afectar a la salud humana, y si no se aplican de manera adecuada pueden ocasionar fitotoxicidad en las plantas y seleccionar poblaciones de nematodos resistentes⁵.

Por lo tanto, es necesario disponer de otras alternativas más compatibles con el ambiente, tales como el control biológico, donde a partir de bacterias del género *Bacillus*, *Pasteurela penetrans* (Thome) y hongos como *Paecilomyces lilacinus* y *Pochonia chlamydosporia*, se han obtenidos biopreparados de gran eficiencia en el control de fitonematodos^{15,16}.

P. chlamydosporia, es un hongo parásito facultativo de huevos de nematodos, formando redes de hifas con órganos especializados que penetran la capa vitelina mediante lisis enzimática, el cual ha mostrado ser un agente potencial de control biológico de nematodos formadores de nódulos (*Meloidogyne* sp.)^{17,18}.

Recientemente, se han reportado trabajos sobre el uso potencial de *Trichoderma* sp. en el control de *Meloidogyne* sp. Aunque, las especies del género *Trichoderma* sp. son más conocidas por estar entre los antagonistas más utilizados para el control de un grupo importante de patógenos del suelo, principalmente de los géneros *Phytophthora* sp., *Rhizoctonia* sp., *Sclerotium* sp., *Pythium* sp. y *Fusarium* sp., entre otros¹⁹.

Existe poca información sobre los mecanismos utilizados por las especies de *Trichoderma* sp. en el control de nematodos. Sin embargo, se hablan de dos mecanismos, el primero es el parasitismo directo de huevos o larvas mediante el aumento de la actividad de quitinasas o proteasas, siendo este un indicativo de infectar huevos de nematodos; y el segundo es la inducción de los mecanismos de defensa de la planta²⁰.

Ferreira *et. al.*²¹, reportó que de todos los aislamientos que realizó, el aislamiento T-1 de *Trichoderma* sp. fue el más eficaz en el control de *M. exigua*, logrando parasitar al 53,33% de los huevos de este nematodo. Así mismo, Madail R.²² reportó que todos los tratamientos “*in vitro*” que realizó con aislamientos de *Trichoderma* sp. parasitaron a los huevos de *M. javanica* envolviéndolos con sus hifas.

Teniendo en cuenta que las especies de *Trichoderma* sp. son muy usadas en el control biológico de hongos fitopatógenos; y que además se ha demostrado que *Trichoderma* sp. también puede controlar nematodos, permitiendo que los agricultores empleen *Trichoderma* sp. no solo como hongo antagonista, sino también como hongo nematófago; haciendo que los costos del tratamiento de sus cosechas



disminuyan ya que necesitarían aplicar un solo tipo de controlador biológico. Por tal motivo, se hace necesaria la búsqueda de hongos que tengan la capacidad de controlar nematodos, por lo cual la presente investigación tiene como objetivo evaluar el efecto de *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* sobre huevos de *Meloidogyne* sp. en condiciones de laboratorio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de cultivo joven de *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. viride* y *P. chlamydosporia*.

A partir de cada cultivo puro de *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. viride*, y *P. chlamydosporia* se procedió a resembrar por puntura respectivamente, en tubos de ensayo conteniendo Agar Papa Dextrosa (APD), los cuales fueron incubados a 25°C durante 7 días, obteniéndose así un cultivo joven de *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. viride* y *P. chlamydosporia*.

Obtención de huevos de *Meloidogyne* sp.

Las masas de huevos fueron extraídas de raíces de *P. volubilis* “Sacha Inchi” que se encontraban infectadas con *Meloidogyne* sp. Las raíces fueron lavadas con agua de caño y los nódulos presentes fueron cortados y llevados al esteroscopio para la extracción de masas de huevos. Las masas de huevos fueron colocadas en frascos de penicilina que contenían una solución de hipoclorito de sodio al 3 % para su lavado, sometiéndolos a agitación por 5 minutos aproximadamente. Luego se enjuagaron 5 veces consecutivas con agua destilada estéril para eliminar trazas residuales de hipoclorito de sodio^{10,22}. En seguida se procedió al conteo del número de huevos de *Meloidogyne* sp.

Estandarización de *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. viride* y *P. chlamydosporia*.

A partir del cultivo puro de cada hongo, mediante la cámara de Neubauer se preparó una suspensión de 10⁶ conidios/mL.

Preparación de Oxamyl.

Se agregó 2 mL del Nematicida a un matraz conteniendo 98 mL de agua destilada, cantidad necesaria para lograr una concentración de 900 ppm.

Inoculación de huevos de *Meloidogyne* sp.

Se colocó 2mL de suspensión de cada tratamiento experimentales en pocillos, por separado, luego se inoculó 1mL de agua destilada estéril con aproximadamente 100 huevos de *Meloidogyne* sp. a cada tratamiento. Para los tratamientos control se siguió con el mismo procedimiento.

Lectura

La evaluación se realizó a las 24, 48 y 72 horas después de la inoculación, realizándose observaciones al microscopio a 40X respectivamente. Cada tratamiento constó de 4 repeticiones.

RESULTADOS

Se observó que tanto *T. atroviride*, *T. harzianum* y *T. viride* como los tratamientos positivos destruyen los huevos de *Meloidogyne* sp., en una secuencia de parasitismo que concluye con la completa destrucción a las 72 horas (Figs. 1, 2, 3 y 4)

DISCUSIÓN

Al evaluar el efecto de *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* sobre huevos *Meloidogyne* sp. se observó que la destrucción que sufren los huevos de *Meloidogyne* sp. por *T. atroviride*, *T. harzianum* y *T. viride* (Fig. 1, 2, 3 y 4), esto quizás se deba a que este género parasita al fitopatógeno mediante enrollamiento, ganchos y cuerpo de tipo apresorio, que penetran la pared celular por acción hidrolítica de las enzimas quitinasas y gluconasas²³. Estas enzimas pueden degradar la cutícula de los insectos, cuya estructura está compuesta por quitina^{24,25,26}. La quitina está presente en la cutícula de los huevos de nematodos, afectándose grandemente con el tratamiento de las especies de *Trichoderma*^{27,28}. Además, *Trichoderma* es capaz de producir diferentes antibióticos volátiles y no volátiles; y que se ha demostrado que puede parasitar, controlar y destruir los fitonematodos¹⁵. Es así que, Pérez *et. al.*²⁹ afirman

que *Trichoderma* spp. es un biorregulador efectivo contra nematodos del género *Meloidogyne* por medio de sus toxinas e hifas. Sharon *et. al.*³⁰, observó que las enzimas extracelulares tales como quitinasas

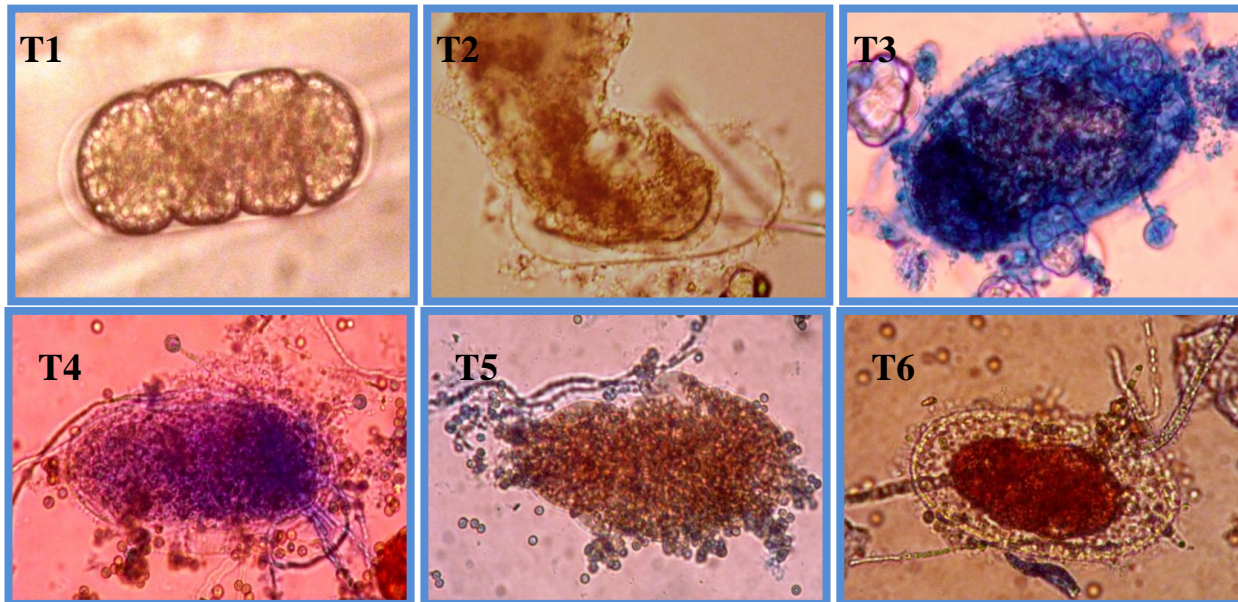


Fig. 1. Observación microscópica (40x) de huevos de *Meloidogyne* sp. sometidos a diferentes tratamiento, luego de 72 horas de inoculación: **T1.** Huevo de *Meloidogyne* solo, **T2.** Huevo de *Meloidogyne* con oxamyl, **T3.** Huevo de *Meloidogyne* sp. con *Pochonia chlamydosporia*, **T4.** Huevo de *Meloidogyne* sp. con *Trichoderma atroviride*, **T5.** Huevo de *Meloidogyne* sp. con *Trichoderma harzianum*, **T6.** Huevos de *Meloidogyne* sp. con *Trichoderma viride*

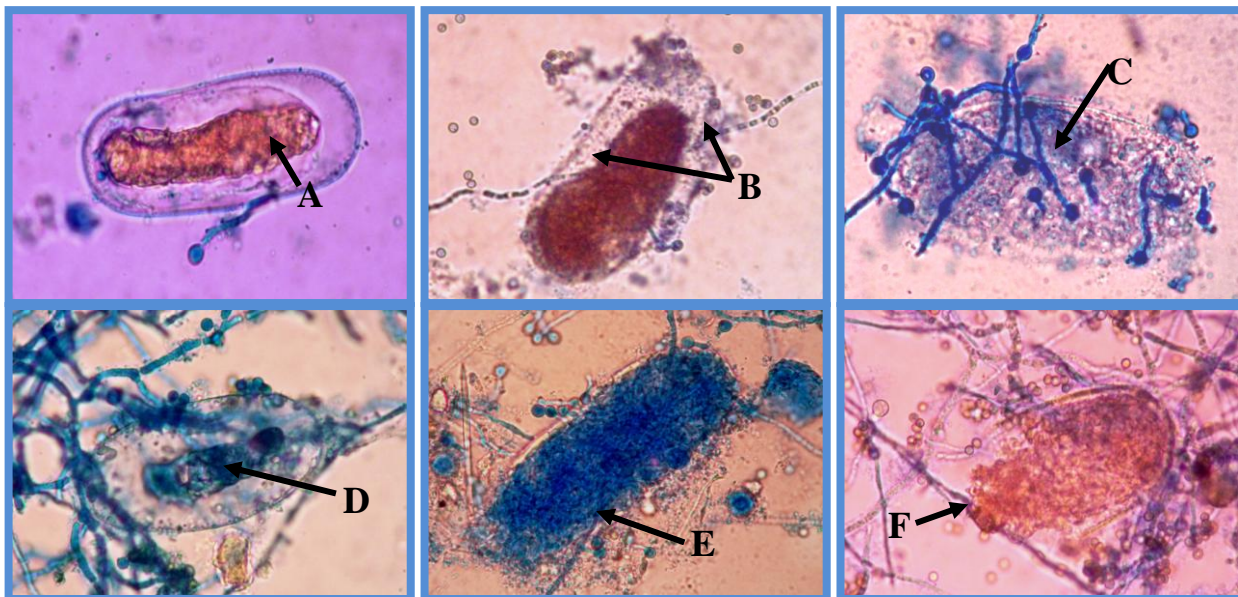


Fig. 2. Observación microscópica (40 x) de la secuencia de destrucción que sufren los huevos de *Meloidogyne* sp. frente a *Trichoderma atroviride*, a las 24, 48 y 72 horas de incubación: **A.** Adherencia de hifa, **B.** Penetración de hifa, **C.** Colonización de hifas, **D.** Deformación de embrión, **E.** Desintegración de pared y **F.** Ruptura de huevo.

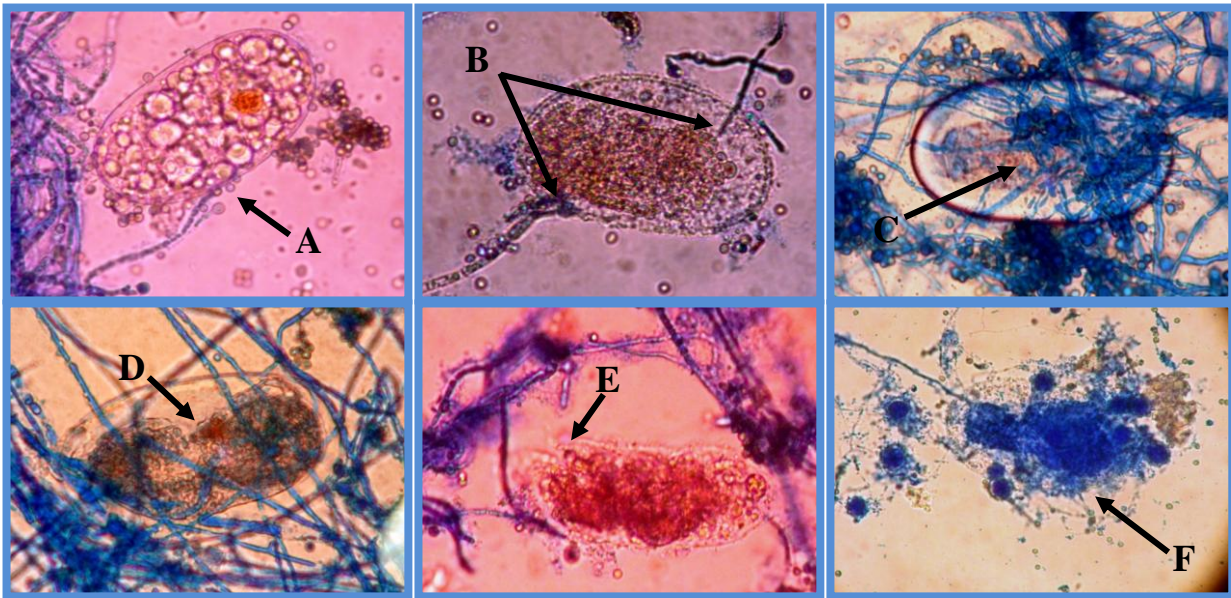


Fig. 3. Observación microscópica (40 x) de la secuencia de destrucción que sufren los huevos de *Meloidogyne* sp. frente a *Trichoderma harzianum*, a las 24, 48 y 72 horas de incubación: A. Adherencia de hifa, B. Penetración de hifa, C. Colonización de hifas, D. Deformación de embrión, E. Desintegración de pared y F. Ruptura de huevo.

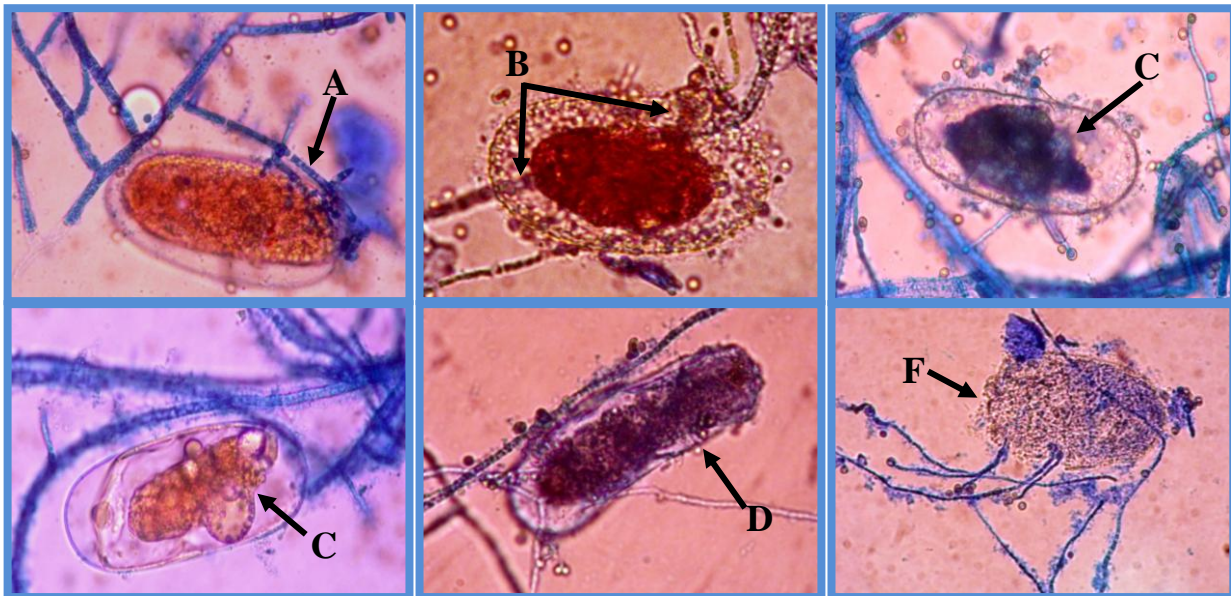


Fig. 4. Observación microscópica (40 x) de la secuencia de destrucción que sufren los huevos de *Meloidogyne* sp. frente a *T. viride*, a las 24, 48 y 72 horas de incubación: A. Adherencia de hifa, B. Penetración de hifa, C. Colonización de hifas, D. Deformación de embrión, E. Desintegración de pared y F. Ruptura de huevo.

y proteasas con actividad antifúngica participan en la relación de interacción de *M. javanica* y *Trichoderma* sp.



Asimismo, si bien la mayoría de los nematocidas como el oxamyl controlan muy bien los nematodos como se puede ver en la Fig 1, este tiene cierto efecto negativo sobre la planta, ya que paralizan su desarrollo radicular, unido a la destrucción de mucha flora microbiana natural³¹.

CONCLUSIÓN

- *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* tienen un efecto negativo sobre los huevos de *Meloidogyne* sp. en condiciones de laboratorio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Godoy T, Yañez M. El nematodo agallador. En: Memorias del curso de fitopatógenos del suelo en hortalizas. Universidad Autónoma de Sinaloa, México; 1999; p. 19 – 22.
2. Sandoval B, Claudio R. Manejo integrado de enfermedades en cultivos hidropónicos. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Universidad de Talca. 2004; p. 1 – 53.
3. Carrillo – Fasio J, García - Estrada R, Allende – Molar R, Márquez – Zequera I, Cruz – Ortega J. Identificación y Distribución de Especies del Nematodos Nodulador (*Meloidogyne* spp.) en Hortalizas, en Sinaloa, México. Rev. Mexicana de Fitopatología. 2000; 18(2): 115 – 119.
4. Guzmán O, Castaño J. Identificación de Nematodos Fitoparásitos en Guayabo (*Psidium guajava* L.), en el Municipio de Manizales (Caldas), Colombia. Rev. Acad. Colomb. Cienc. 2010; 34 (130): 117 – 125.
5. Cristóbal J, Herrera – Parra E, Reyes V, Ruiz E, Tun J, Celis T. *Glomus intraradices* para el control de *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood en condiciones protegidas. Rev. Fitosanidad. 2010; 14: 25 – 29.
6. Leyva A, Castellanos L, Pérez A. Alternativas de lucha contra nematodos noduladores en el cultivo del pepino en condiciones de organopónicos. Rev. Centro Agrícola. 2009; 36(2): 5 – 10.
7. Castagnone - Sereno P. Genetic variability of nematodes: a threat to the durability of plant resistance genes? Euphytica. 2002; 124: 193 – 199.
8. Ornat C, Verdejo – Lucas S. Distribución y Densidad de Población de *Meloidogyne* spp. en Cultivos Hortícolas de la Comarca de El Maresme (Barcelona). Rev. Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg. 1999; 14 (2): 191 – 201.
9. Jacquet M, Bongiovanni M, Martínez M, Verschave P, Wajnberg E, Castagnone-Sereno P. Variation in resistance to the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in tomato genotypes bearing the *Migene*. Rev. Plant Pathol. 2005; 54: 93 – 99.
10. Cedeño D. Control de *Meloidogyne* spp. en pepino (*Cucumis sativa*) con Micorriza Vesículo Arbuscular (VAM) (Mycoral®), *Trichoderma harzianum* y *Paecilomyces lilacinus*. [Tesis para optar el Grado Académico de Licenciado]. Honduras: Zamorano; 2005.
11. Vanholme B, De Meutter J, Tytgat T, Van Montagu M, Gheysen G. Secretions of plant – parasitic nematodes: A molecular update. Rev. Gene. 2004; 332: 13 – 27.
12. Arias Y, González I, Rodríguez M, Rosales C, Suárez Z, Peteira B. Aspectos generales de la interacción tomate (*Solanum lycopersicon* L.) – *Meloidogyne incognita*. Rev. Protección Veg. 2009; 24: 1 – 13.
13. Karssen G, Moens M. Root – knot nematodes. En Plant Nematology (Perry R, Moens M *et. al.*). Rev. Plant Nematology. Wallingford, U.K. 2006.
14. Costam M *et. al.* Patogenicidade e reproducao de *Meloidogyne incognita* em tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) com aplicacao de filtrados fungicos ou extratos de plantas e de esterco animais. Rev. Nematologia Brasileira, Brasilia. 2000; 24: 219 – 226.
15. Baños Y *et. al.* Efecto de enmiendas orgánicas y *Trichoderma* spp. en el manejo de *Meloidogyne* spp. Rev. Bras. de Agroecología. 2010; 5(2): 224 – 233.
16. Madail R. Potencial do uso dos fungos *Trichoderma* spp. e *Paecilomyces lilacinus* no biocontrole de *Meloidogyne incognita* em *Phaseolus vulgaris*. [Tese Doutoral]. Porto Alegre (RS), Brasil: Universidade Federal do Rio Grande do sul Faculdade de Agronomia; 2008.
17. Hidalgo L, Bourne J, Kerry B, Rodríguez M. Nematophagous *Verticillium* spp. in soil infested with *Meloidogyne* spp. on coffee in Cuba. Isolation and characterization. Rev. International Journal Pest Management. 2000; 46: 277 - 284.
18. Atkins S, Hidalgo L, Kalisk H, Mauchline T; Hirsch P, Kerry B. Development of a new management strategy for the control of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) in organic vegetable production. Rev. Pest Management Science. 2003; 59: 183 – 189.



19. Ezziyyani M, Pérez C, Sid A, Requena M, Candela M. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annum* L.). Rev Anales de Biología. 2004; 26: 35 – 45.
20. Sharon E *et. al.* Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. Rev. Biological Control. 2001; 91 (7): 687- 693.
21. Ferreira P, Ferraz S, Lopes E, Grassi L. Parasitismo de ovos de *Meloidogyne exigua* por fungos nematófagos e estudo da compatibilidade entre os isolados fúngicos. Rev. Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas. 2008; 2 (3): 15.
22. Zavaleta E. Alternativas del manejo de las enfermedades de las plantas. Rev. Terra. 1999; 17 (3): 201 – 207.
23. Zeilinger S, Omann M. *Trichoderma* biocontrol: signal transduction pathways involved in host sensing and mycoparasitism. Rev. Gene Regul Syst Bio. 2007; 1: 227 – 234.
24. Sharma P, Pandey R. Biological control of root-knot nematode; *Meloidogyne incognita* in the medicinal plant; *Withania somnifera* and the effect of biocontrol agents on plant growth. Rev. Afr J Agric Res. 2009; 4(6): 564 – 567.
25. Bokhari F. Efficacy of some *Trichoderma* species in the control of *Rotylenchulus reniformis* and *Meloidogyne javanica*. Rev. Arch Phytopathol Plant Prot. 2009; 42(4): 361 – 369.
26. Shakeri J, Foster HA. Proteolytic activity and antibiotic production by *Trichoderma harzianum* in relation to pathogenicity to insects. Rev. Enzyme Microb. Technol. 2007; 40(4): 961 – 968.
27. Haggag W, Amin A. Efficiency of *Trichoderma* species in control of *Fusarium* root knot and reniform nematodes disease complex on sunflower. Rev. Pakistan J Biol Sci. 2001; 4(3): 314 – 318.
28. Jin R, Suh J, Park R, Kim Y, Krishnan H, Kim K. Effect of chitin compost and broth on biological control of *Meloidogyne incognita* on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Rev. Nematology. 2005; 7: 125 – 132.
29. Pérez J *et. al.* *Trichoderma*: alternativa para el control biológico de nematodos en el marco de una agricultura sostenible. Rev. Fitosanidad. 2006; 10 (2): 165.
30. Sharon E. Parasitism of *Trichoderma* on *Meloidogyne javanica* and role of the gelatinous matrix. Rev. Europa Journal Plant Pathology, London. 2007; 118: 247 – 258.
31. Calvo B, López R. Combate de *Meloidogyne incognita* en dos cultivos de tabaco Burley. Rev. Agronom. Costarr. 1980; 4 (2): 175 – 180.