



Revista Colombiana de Biotecnología

ISSN: 0123-3475

ISSN: 1909-8758

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia

Marín-Pavas, Duber Alexander; Alzate-Tamayo, Juan Pablo; Calle-Restrepo, Alejandro; Salazar-Moncada, Diego Alberto; Ocampo-Jiménez, Omar; Calle-Osorno, Jaime de Jesús
Potencial nematicida de hongos aislados de cultivos de plátano dominico hartón (*Musa* AAB Simmonds) del suroeste antioqueño

Revista Colombiana de Biotecnología, vol. XXIV, núm. 1, 2022, Enero-Junio, pp. 46-55
Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia

DOI: <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v24n1.99038>

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77672585005>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica Redalyc
Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Potencial nematocida de hongos aislados de cultivos de plátano dominico hartón (*Musa AAB Simmonds*) del suroeste antioqueño

Nematicidal potential of fungi isolated of Plantain crops (*Musa AAB Simmonds*) from southwest Antioquia

Duber Alexander Marín-Pavas*, Juan Pablo Alzate-Tamayo**, Alejandro Calle-Restrepo***, Diego Alberto Salazar-Moncada****, Omar Ocampo-Jiménez*****, Jaime de Jesús Calle-Osorno*****

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v24n1.99038

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar el potencial nematocida de aislados fúngicos provenientes de cultivos de plátano de los municipios de Andes y Jardín (Suroeste antioqueño). Se analizaron *in vitro* diez aislados fúngicos frente a los nematodos fitoparásitos de los géneros *Meloidogyne* y *Radopholus*. Los hongos pertenecían a los géneros *Paecilomyces*, *Pochonia*, *Arthrobotrys*, *Lecanicillium* y *Metarhizium*. Se realizaron pruebas metabólicas cualitativas con diversos sustratos con el fin de observar la capacidad de degradación de diferentes compuestos característicos en la estructura de huevos o juveniles de nematodos. También, se evaluó la capacidad de colonizar huevos o juveniles de *Meloidogyne* sp. y, la mortalidad de los aislados frente a los géneros *Meloidogyne* y *Radopholus*. Se encontró que la mayoría de los aislados fueron capaces de degradar Tween 80 (90% de los aislados), seguido de caseína (80%), gelatina (80%), Tween 20 (60%), y en menor medida quitina (40% de los aislados); además, el 30% de los aislados presentaron formación de cristales en los medios de Tween. El 70% de los aislados podían infectar huevos, mientras que el 30% restante infectaban juveniles (J₂) de *Meloidogyne* sp., después 24 horas de incubación. En cuanto al porcentaje de mortalidad del hongo y el filtrado, se encontró que todos los aislados difieren del control ($p < 0.05$), siendo aislados de los géneros *Pochonia* y *Paecilomyces* quienes presentaron porcentajes de mortalidad superiores al 90%.

Palabras claves: Antagonismo, control biológico, *Meloidogyne*, *Radopholus*, *Paecilomyces*, *Pochonia*.

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the nematicidal potential of fungal isolates from plantain crops in the municipalities of Andes and Jardín (Southwest Antioquia). Ten fungal isolates were analyzed *in vitro* against phytoparasitic nematodes of the genera *Meloidogyne* and *Radopholus*. The fungi belonged to the genera *Paecilomyces*, *Pochonia*, *Arthrobotrys*, *Lecanicillium*, and *Metarhizium*. Qualitative metabolic tests were carried out with various substrates to observe the degradation capacity of different characteristic compounds in the structure of nematode eggs or juveniles. Also, the ability to colonize eggs or juveniles of *Meloidogyne* sp. and, the mortality of the isolates against the genera *Meloidogyne* and *Radopholus* were evaluated. It was found that most isolates were

* Ingeniero Agrónomo, Magister en Biología, Universidad de Antioquia, Cl. 67 No. 53-108, Medellín, Colombia, dalexander.marin@udea.edu.co

** Universidad de Antioquia, Biólogo

*** Universidad de Antioquia, Biólogo, alcare04@gmail.com

**** PhD en Biología, Universidad de Antioquia, Cl. 67 No. 53-108, Medellín, Colombia, diego.salazar@udea.edu.co

***** PhD en Biología, Universidad de Antioquia, Cl. 67 No. 53-108, Medellín, Colombia, jaime.calle@udea.edu.co

capable of degrading Tween 80 (90% of isolates), followed by casein (80%), gelatin (80%), Tween 20 (60%), and to a lesser extent chitin (40 % of isolates); in addition, 30% of the isolates presented crystal formation in the Tween media. 70% of the isolates could infect eggs, while the remaining 30% infected juveniles (J2) of *Meloidogyne* sp., after 24 hours of incubation. Regarding the percentage of mortality of the fungus and the filtrate, it was found that all the isolates differ from the control ($p < 0.05$), and some isolates of the genera *Pochonia* and *Paecilomyces* who presented mortality percentages higher than 90%.

Key words: Antagonism, biocontrol, *Meloidogyne*, *Radopholus*, *Paecilomyces*, *Pochonia*.

Recibido: octubre 14 de 2021 **Aprobado:** mayo 10 de 2022

INTRODUCCIÓN

El plátano y el banano son productos agrícolas de alta producción en Colombia y en el mundo lo que genera un impacto positivo en la economía de los países en desarrollo y es la fuente de ingreso de muchos pequeños y medianos agricultores (FAO, 2004), al ser un producto indispensable para la canasta familiar, debido al aporte de carbohidratos, potasio, nitrógeno y vitaminas A y B.

Los cultivos de musáceas son afectados por factores bióticos que determinan su desarrollo, por ejemplo, aquellos que actúan como plaga o producen enfermedades y generan inconvenientes que se ven reflejados en la calidad, la producción y los costos. En este sentido, se ha reportado que los nematodos fitoparásitos son organismos que afectan la producción de musáceas en diferentes partes del mundo (Vergara-Alzate *et al.*, 2012). De manera significativa, los géneros *Radopholus* y *Meloidogyne* afectan los cultivos de musáceas y aunque la información respecto a pérdidas de producción son escasas, se ha estimado que, dependiendo del cultivar, variedad o clon, las condiciones agroecológicas, y la falta de conocimiento y manejo de nematodos, estas pueden variar entre el 20 al 100% (Araya, 1995; Guzmán-Piedrahita, 2011). De manera similar, a nivel mundial se han estimado en pérdidas anuales que ascienden a \$100 billones de dólares (Menjívar-Barahona, 2005).

Una de las alternativas para el control de los nematodos fitoparásitos son los hongos nematófagos, habitantes del suelo y saprófitos en su mayoría. Estos, pueden utilizar los diferentes estadios de los nematodos como fuente nutricional, mediante diferentes mecanismos de acción como el parasitismo o predación de huevos, juveniles o hembras, lo cual es posible mediante la producción de estructuras trampa, toxinas o compuestos con actividad nematocida (Gray, 1985). En estos mecanismos son necesarias enzimas para que se activen y desarrollen los procesos de reconocimiento e infección. Algunas de estas enzimas son: proteasas (como colagenasas o serín-proteasas), quitinasas o lipasas (Olivares, 1999).

Existen reportes de hongos nematófagos aislados de diversos cultivos en diferentes regiones del mundo, pero son pocos los reportados en cultivos de musáceas, como el de Kilama *et al.* (2007) con el género *Paecilomyces*, o el de Wachira *et al.* (2013) con el género *Arthrobotrys*. Por lo que, el objetivo de este trabajo fue analizar las características metabólicas y evaluar el potencial nematocida de diez aislados fúngicos, aislados de cultivos de plátano de los municipios de Andes y Jardín (ubicados en el suroeste antioqueño).

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento e identificación de morfotipos fúngicos

Se tomaron muestras de suelo de cultivos de plátano convencionales, ubicados en los municipios de Jardín (Finca El Silencio: Altitud 1870+/-13m, N 5°35.118' - W 75°48.036', Datum: WGS84) y Andes (Finca La Camélida: Altitud 1225,7 +/- 11m, N 05°41.900' - W 75°54.390', Datum: WGS84), que no hayan sido sometidos recientemente a algún tipo de control para nematodos. Las muestras fueron transportadas al laboratorio de Biocontrol y Microbiología Ambiental (BIOMA) de la Universidad de Antioquia, donde fueron procesadas bajo la metodología de Barron (1977), la cual consiste en cajas Petri con agar-agua al 2%, donde se esparce 1 gramo de suelo y se añade un cebo de nematodos. Los hongos aislados se conservaron en el medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) y fueron utilizadas claves morfológicas de Seifert y Gams (2011) para la identificación de los diferentes morfotipos obtenidos. Se trabajó con 10 aislados provenientes del mismo sitio (Finca El Silencio).

Características metabólicas

Se realizó una evaluación cualitativa con la metodología de halos de degradación en medio sólido (Hankin y Anagnostakis, 1975) con el objetivo de observar si los aislados producen producir enzimas extracelulares, determinando la capacidad quitinolítica, proteolítica o lipolítica, mediante la degradación de diferentes sustratos. En todos los medios se utilizó un medio base, el cual consistió de agar-agar (1%), NaCl (0,3 g*L⁻¹), MgSO₄*7H₂O (0,3 g*L⁻¹), K₂HPO₄ (0,3 g*L⁻¹).

Capacidad quitinolítica: Se determinó la capacidad de degradar quitina mediante el método de Esteves *et al.* (2009), con modificaciones. El cual consistió en medio base adicionado de quitina coloidal (0,5%) (en base a la metodología de Castro *et al.* (2011)), y se ajustó el pH a 7,0 con NaOH 1N.

Capacidad proteolítica: Para observar esta capacidad, se determinó por un lado la degradación de caseína mediante un medio comercial Agar Glucosa-Peptona de caseína® (Merck), el cual posee un indicador de pH (púrpura de bromocresol). También se utilizó un medio con gelatina, con la metodología propuesta por Olivares (1999) con modificaciones, y el medio consistió en un medio base y gelatina (1%).

Capacidad lipolítica: Para determinar esta capacidad, se utilizó la metodología propuesta por Olivares (1999) con modificaciones, preparando dos medios que consistían en medio base, gelatina (0,1%), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,2 g* L⁻¹), y Tween 20 (1%) o Tween 80 (1%). El sustrato y el medio fueron esterilizados aparte y mezclados al momento de servir.

Cada capacidad metabólica fue evaluada tres veces, con tres repeticiones en cada montaje, los diez aislados se sembraron en los diferentes medios de cultivo e incubaron durante 8 días a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ bajo condiciones de oscuridad. La presencia de halos alrededor de la colonia se consideró como resultado positivo de la degradación del sustrato. Además, se clarificó el halo mediante la adición de ácido tricloroacético al 35% (TCA) (Medina y Baresi, 2007), y en el medio de quitina también se utilizó Lugol de Gram (Verma y Garg, 2018); debido al hecho de que en algunos medios no era posible observar los halos de forma clara. Por su parte, en los medios de Tween, se analizó la presencia de cristales precipitados en el medio.

Cultivo de nematodos de los géneros *Radopholus* y *Meloidogyne*

Los nematodos del género *Meloidogyne* fueron aislados de plantas de banano de un predio ubicado en la vereda La Casiana del municipio de Jardín (Antioquia), mediante la metodología de Ortiz-Paz *et al.* (2015), multiplicados en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* variedad Santa Clara) de 20 días a partir de la germinación y sembradas en un sustrato esterilizado con Basamid a 50 g*m², con riego día por medio; se verificó la ausencia de nematodos después de la aplicación del Basamid. Las plantas se cosecharon a los 45 días de crecimiento y el procedimiento se repitió para obtener huevos de nematodos y juveniles (J₂) de *Meloidogyne* sp., en este caso se esterilizaron en una solución de cloranfenicol y sulfato de estreptomicina a 100 ppm durante 5 minutos, y se lavaron

tres veces con agua destilada estéril. Por último, se realizó el conteo y se ajustó la concentración a 150 nematodos en 100 microlitros (Castillo-Russi *et al.*, 2010).

En el caso del género *Radopholus*, los nematodos se aislaron de raíces de plátano provenientes de una finca ubicada en la vereda San Bartolo en el municipio de Andes (Antioquia), mediante la metodología de Jenkins (1964), y se multiplicaron en plantas de banano con un mes de establecimiento en suelo esterilizado con Basamid, se regaron día por medio; se verificó la ausencia de nematodos después de la aplicación del Basamid. Después de 4 meses de incubación, se cosecharon las plantas, y se extrajeron los nematodos, esterilizando con una solución de cloranfenicol y sulfato de estreptomicina a 100 ppm durante 5 minutos, y lavados con agua destilada estéril (tres veces). Finalmente, los nematodos se contaron y se ajustó su concentración a 150 nematodos en 100 microlitros (Vergara-Alzate *et al.*, 2012). Los nematodos se identificaron mediante la clave de Mai y Mullin (1996).

Inóculo y filtrado fúngico

Se prepararon suspensiones de conidias a una concentración de $10^6 \cdot \text{L}^{-1}$ para el inóculo fúngico utilizando la metodología de Aminuzzaman *et al.* (2013), el cual consiste en recuperar conidias de cultivos de ocho días de crecimiento en agua destilada estéril. Este procedimiento se realizó para los 10 aislados. En el caso del filtrado fúngico se utilizó la metodología de Singh y Mathur (2010). Este procedimiento se realizó para 9 aislados, debido a que no fue posible filtrar el contenido del aislado Lec28. Se trabajó entonces con 10 suspensiones de conidias y 9 filtrados.

Potencial nematocida

La caracterización de los aislados requirió de un primer ensayo cualitativo, con el fin de determinar su capacidad de infectar o colonizar estadios de *Meloidogyne* sp. Se realizó la metodología de Castillo *et al.* (2010), utilizando cajas de Petri de 6 cm de diámetro, en las que se añadió 900 microlitros (μL) de agua destilada estéril más 100 microlitros de la suspensión de conidias a una concentración de $10^6 \cdot \text{L}^{-1}$, y se añadieron por separado 10 huevos o 10 individuos del estadio J₂ del género *Meloidogyne*. Los montajes se incubaron durante 24 horas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ en oscuridad. Pasado este tiempo, mediante el microscopio compuesto (Marca Carl Zeiss, modelo Axiostar), se determinó la capacidad de infectar o colonizar huevos o juveniles de este género de cada uno de los aislados mediante el crecimiento del micelio fuera y dentro del blanco. Este experimento se realizó una sola vez y se tuvo en cuenta un tratamiento control con huevos o nematodos en agua destilada estéril con Tween 20.

Para la evaluación cuantitativa, con el fin de establecer la capacidad de control de los hongos o su filtrado, se utilizó un montaje en platos de 24 pozos. En cada pozo se añadió 1 mL del filtrado o de la suspensión de conidias a la concentración 10^6 L^{-1} y 100 μL de la suspensión de nematodos con 150 nematodos; como controles se utilizó PDB estéril o agua destilada estéril con Tween 20 al 0.1%, respectivamente y para cada género de nematodo. Los montajes se incubaron a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ en oscuridad durante 72 h (Aminuzzaman *et al.*, 2018). Posteriormente, se realizó la lectura del experimento en un microscopio invertido Zeiss, y se confirmó la viabilidad de nematodos añadiendo 100 μL de NaOH 1N en cada pozo (Xiang y Lawrence, 2016). Se realizó el conteo de 100 nematodos, determinando si estaban vivos (aquellos que presentaban movilidad) o muertos (si no presentaban movilidad), con o sin presencia de micelio colonizando los tejidos.

Los platos multipozo fueron separados por género de nematodo (*Meloidogyne* o *Radopholus*) y en cada plato se analizaron dos réplicas de cada hongo y del control distribuidos completamente al azar (dejando dos pozos con agua destilada estéril), teniendo 11 tratamientos en el caso de los hongos y 10 para los filtrados; este procedimiento se repitió tres veces, y en cada ocasión se realizaban tres montajes para cada género nematodo.

Análisis estadístico

Para analizar el efecto de los hongos aislados o su filtrado sobre la mortalidad de los nematodos, se separaron los tratamientos en cuatro grupos. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía ($\alpha=0.05$) en cada grupo. Para observar cuál tratamiento mostró diferencias estadísticamente significativas respecto al control y al resto de los tratamientos dentro de cada grupo, se realizó una prueba Tukey ($\alpha=0.05$). Los grupos fueron: Hongo vs *Meloidogyne* (HvsM), Hongo vs *Radopholus* (HvsR), Filtrado vs *Meloidogyne* (FvsM) y Filtrado vs *Radopholus* (FvsR). Los análisis se realizaron con el apoyo del software R-Studio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislado e identificación de morfotipos fúngicos

Se obtuvieron trescientos aislados de las 2 muestras de suelo, de los cuales se descartaron aquellos morfotipos que se presentan como contaminantes, habitantes comunes del suelo o de poco interés comercial, así como los morfotipos de géneros como *Trichoderma* o *Gliocladium*, lo cual también ha sido reportado por Eapen *et al.*, (2005), reportando que algunos de estos hongos pueden cumplir funciones de descomposición, más que de biocontrol ante un estadio de algún nematodo. Por tal motivo, se seleccionaron 10 morfotipos de géneros reportados previamente como nematófagos, *Pochonia*

(Poc01), *Lecanicillium* (Lec28), *Arthrobotrys* (Art40), *Metarhizium* (Met79) y *Paecilomyces* (Pae07, Pae22, Pae26, Pae48, Pae67, Pae70), donde, Lec28 y Art40 provenían de la Finca La Camélida, y el resto de la Finca El Silencio.

Caracterización metabólica

Los resultados de la actividad metabólica (tabla 1) permitieron establecer que el 90% de los aislados eran capaces de degradar Tween 80, seguido de un 80% para caseína y gelatina, 60% con Tween 20 y en menor medida en un 40% con quitina; además, un 30% de los aislados presentaron formación de cristales en ambos medios de Tween.

Se observó que los aislados Poc01, Pae07 y Pae48 presentaron degradación de los cinco compuestos evaluados en medios sólidos. Pae22 que degradó cuatro compuestos. Pae26, Lec28, Pae67, Pae79 y Met79 degradaron tres compuestos y Art40 solo degradó uno de los compuestos evaluados. Esta metodología permite determinar si un microorganismo presenta o no una enzima específica (Hankin y Anagnostakis, 1975), además, algunos autores han reportado que, la producción de enzimas *in vitro* está fuertemente correlacionado con el proceso de infección o colonización de huevos o nematodos por parte de un aislado (Esteves *et al.*, 2009; Wei *et al.*, 2009; Ng'ang'a *et al.*, 2011). A continuación, se describen los resultados de las diferentes capacidades metabólicas evaluadas.

La capacidad quitinolítica se presentó en cuatro aislados que presentaron halos en las placas de Petri con quitina, los cuales correspondieron a géneros previamente reportados con dicha capacidad metabólica, como *Pochonia* (Esteves *et al.*, 2009) y *Paecilomyces* (Binh *et al.*, 2019). En la mayoría de los aislados fue posible observar halos sin la adición de TCA o Lugol de Gram, aunque se encontró que ambos compuestos ayudaban a visualizar el halo (figura 1). La formación de halos de degradación en medios con quitina sugiere que el aislado en la placa es capaz de hidrolizar la quitina a compuestos más simples mediante la expresión de enzimas quitinasas (Wei *et al.*, 2009). Y la presencia de quitinasas en hongos nematófagos es importante debido a que, la quitina es uno de los principales constituyentes de la cutícula de nematodos y de la cubierta de huevos de estos (Bird, 1968).

Se encontró que el halo de degradación para determinar la capacidad lipolítica fue visible después de la adición de TCA, lo cual se dio en la mayoría de los aislados, lo cual se ha reportado previamente en géneros como en *Pochonia* y *Lecanicillium* (Olivares, 1999) o *Paecilomyces* (Ali y Moharram, 2014). Se ha reportado que la degradación de los ácidos grasos genera precipitados de

Tabla 1. Producción de enzimas en medio sólido por los aislados.

Aislado	Género	Quitina	Gelatina	Caseína	Tween 20	Tween 80
Poc01	<i>Pochonia</i>	X	X	X	X ^c	X ^c
Pae07	<i>Paecilomyces</i>	X	X	X	X	X
Pae22	<i>Paecilomyces</i>		X	X	X ^c	X ^c
Pae26	<i>Paecilomyces</i>		X	X		X
Lec28	<i>Lecanicillium</i>		X		X ^c	X ^c
Art40	<i>Arthrobotrys</i>			X		
Pae48	<i>Paecilomyces</i>	X	X	X	X	X
Pae67	<i>Paecilomyces</i>		X		X	X
Pae70	<i>Paecilomyces</i>		X	X		X
Met79	<i>Metarhizium</i>	X		X		X

^cproducción de cristales en medio.

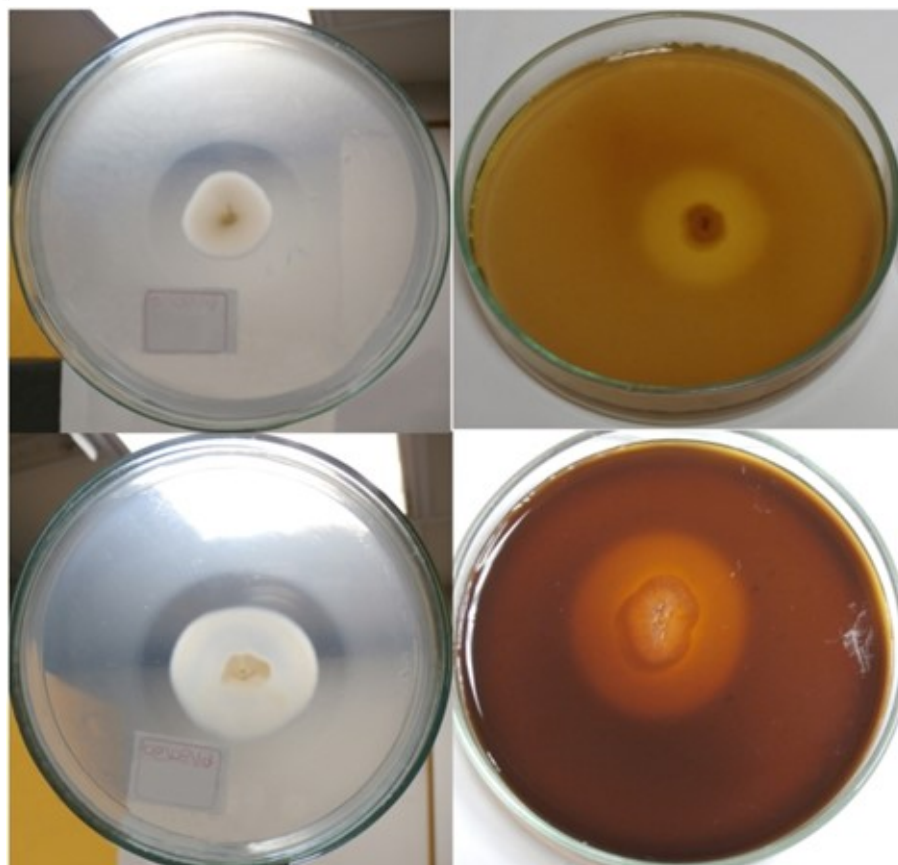


Figura 1. Halos de degradación de quitina en medio sólido por los aislados Poc01 (superior) y Met79 (inferior), revelados con TCA (izquierda) y Lugol de Gram (derecha).

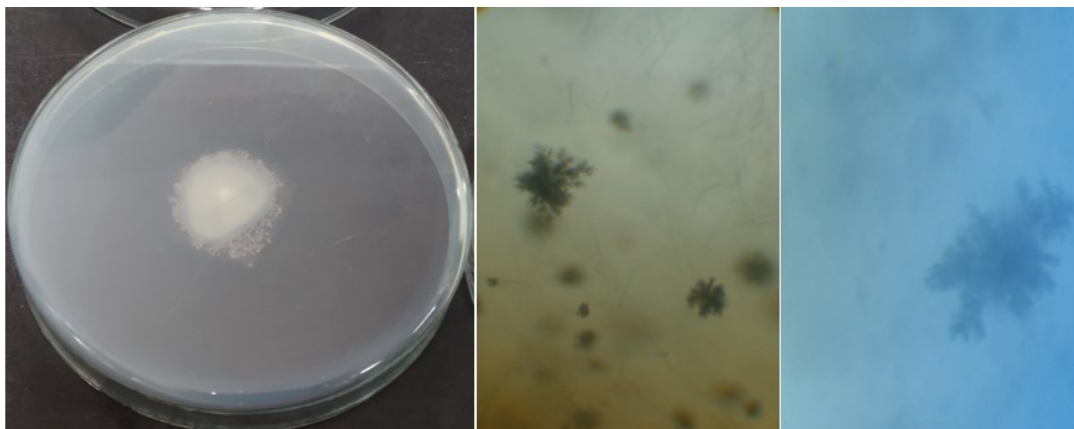


Figura 2. Precipitado en medio con Tween 20 del aislado Lec28 y cristales observados en microscopio invertido (40X).

sales de calcio, como cristales visibles alrededor del sitio de inoculación, lo que se evidenció en los aislados Lec28, Poc01 y Pae22 (figura 2) (Hankin y Anagnostakis, 1975; Kumar *et al.*, 2012).

Para la capacidad proteolítica evaluada en los medios con gelatina (figura 3), no fue posible observar halos de degradación sin el TCA. En cuanto al medio de caseína, el viraje del color del medio se presentó en aquellos hongos que podían degradar la caseína. Además, la capacidad proteolítica es de gran interés, debido a que la cutícula de los nematodos y la cubierta de sus huevos está compuesta en su mayoría por proteínas (principalmente colágeno) (Binh *et al.*, 2019). Incluso, se ha sugerido que varias proteasas extracelulares están implicadas en la parálisis y la mortalidad de diferentes nemátodos, siendo estos compuestos el principal componente activo de los filtrados fúngicos (Ng'ang'a *et al.*, 2011). Se ha reportado esta actividad en géneros como *Pochonia*, *Paecilomyces* y *Lecanicillium* (Olivares, 1999), aunque, esta es una característica que depende del aislado, como lo reportaron Mustafa y Kaur (2009), quienes encontraron aislados de *Metarhizium anisopliae* que po-

dían degradar gelatina o caseína, ambos, uno o ninguno de estos.

Al evaluar el potencial nematocida, se encontró que a las 24 horas el 70% de los 10 aislados podían infectar o colonizar huevos de *Meloidogyne* sp., representados en los aislados *Paecilomyces* (Pae07, Pae22, Pae48, Pae67), *Pochonia* (Poc01), *Lecanicillium* (Lec28) y *Metarhizium* (Met79), mientras que, el 30% restante podían infectar o colonizar J₂, representados en los géneros *Paecilomyces* (Pae26, Pae70) y *Arthrobotrys* (Art40). Es necesario evaluar la capacidad de control de un organismo frente a un blanco determinado para conocer y utilizar su potencial de manera eficiente. Por ejemplo, en el estudio de Eapen *et al.* (2005), encontraron que, de 110 aislados, 69 podían parasitar hembras de *Meloidogyne* spp., y solo tres aislados de los géneros *Paecilomyces*, *Trichoderma* y *Verticillium* presentaron porcentaje de mortalidad significativo. También, de 149 aislados, ninguno afectó J₂ de *Meloidogyne* spp. y 115 fueron capaces de colonizar la matriz gelatinosa de las masas de huevos, pero sólo 30 de éstos últimos podían colonizar e infectar huevos.

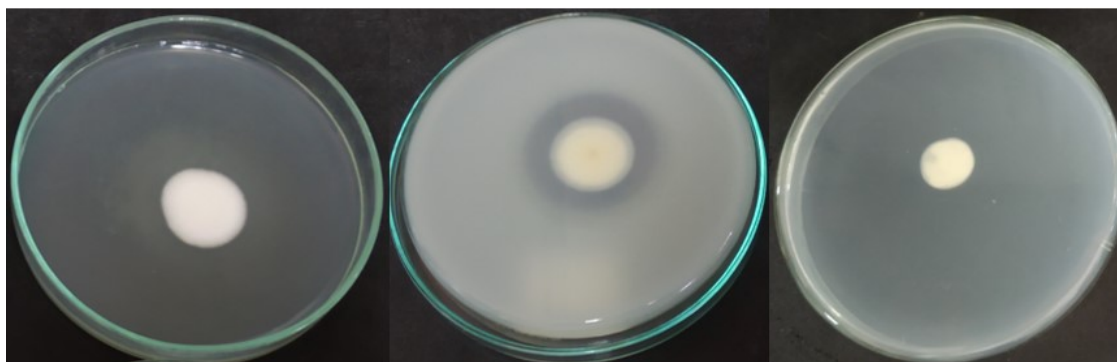


Figura 3. Aislado Pae48 en medio de cultivo con gelatina, antes de la aplicación del TCA (izquierda) y después de la aplicación del TCA (centro) resultado positivo, y resultado negativo en el aislado Met79 después de la aplicación del TCA (izquierda).

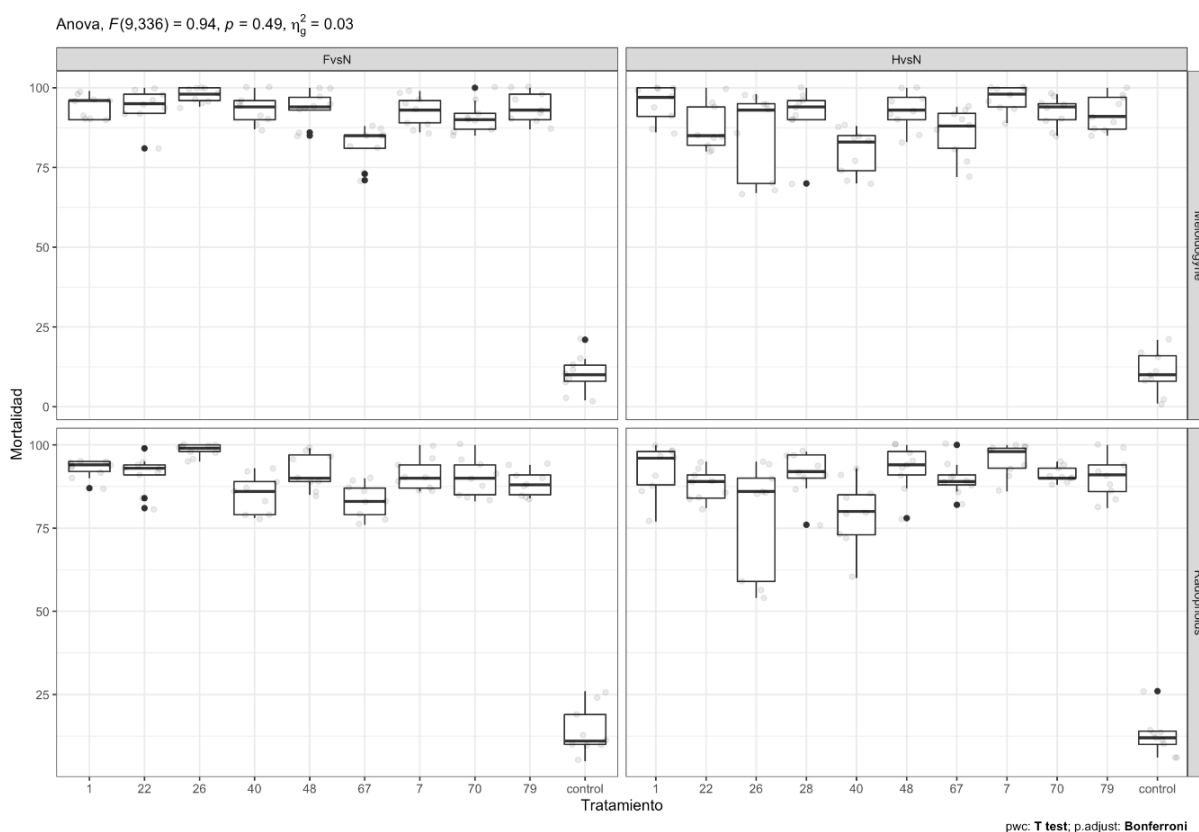
Conforme a la mortalidad de los hongos y su filtrado, en la figura 4 se presenta mediante diagramas de cajas el porcentaje de mortalidad de los nematodos por parte los hongos (H vs N) y sus filtrados (F vs N) frente a los nematodos de los géneros *Meloidogyne* y *Radopholus*.

De acuerdo con el análisis de ANOVA, se encontró que para cada uno de los grupos existe al menos un tratamiento cuya media es diferente a la media del tratamiento control ($p < 0.01$). Por su parte, la prueba de comparaciones de medias Tukey mostró que cada tratamiento en cada grupo tenía diferencias estadísticamente significativas frente al control, por lo que, se analizaron las diferencias estadísticamente significativas entre pares de combinaciones de los diferentes grupos ($p < 0.05$), con el fin de hallar los tratamientos con mayores porcentajes de mortalidad:

- *Hongo vs Meloidogyne (HvsM)*: En este grupo los tratamientos Poc01 y Pae7 presentaron los mayores valores en las medias ($97,26 \pm 5,79$ y $98,16 \pm 4,04$ respectivamente), pero no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre estos o con respecto al resto de los tratamientos.

- *Hongo vs Radopholus (HvsR)*: Para este grupo los tratamientos Poc01 y Pae07 presentaron las medias más altas respecto al resto de tratamientos ($96,86 \pm 8,10\%$ y $98,84 \pm 5,25\%$ respectivamente), además, presentaron una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) con los tratamientos Pae26 y Art40.
- *Filtrado vs Meloidogyne (FvsM)*: En este grupo los valores mayores en las medias se encontraron en los tratamientos Pae26, Poc01 y Pae22 con valores de $98,54 \pm 2,59\%$, $96,88 \pm 3,77\%$ y $94,75 \pm 6,22\%$ respectivamente.
- *Filtrado vs Radopholus (FvsR)*: Para este grupo el tratamiento Pae26 mostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en 5 comparaciones, con un valor de media de $99,13 \pm 1,96\%$. Seguido por los aislados Poc01 y Pae22, con valores por encima del 90% ($94,25 \pm 3,34\%$ y $92,17 \pm 6,29\%$ respectivamente), pero los cuales no presentaron interacciones con diferencias estadísticamente significativas respecto a los otros tratamientos ($p < 0.05$).

De manera general, en la mayoría de los aislados los porcentajes de mortalidad fueron superiores al 79%. Y los géneros más representativos fueron *Pochonia* y *Pae-*



cilomyces, aunque nuestros resultados difieren de otros autores. Como con Ortiz-Paz *et al.* (2015), quienes reportaron que el porcentaje de mortalidad oscilaba alrededor de 50% en juveniles de *M. incognita* y *M. mayaguensis* con un aislado de *P. chlamydosporia* y otro de *P. lilacinum*, bajo una concentración de $10^7 \times L^{-1}$ conidias por mililitro, y un tiempo de evaluación de 168 horas. O lo reportado por Vergara-Alzate *et al.* (2012), quienes encontraron un aislado de *P. lilacinum* que controló el 62% de los juveniles de *R. similis*, mientras que *P. chlamydosporia* controló el 66% de los juveniles de *R. similis*.

Finalmente, en los filtrados analizados, los porcentajes de mortalidad fueron superiores al 90% frente a *Meloidogyne* sp. y superiores al 80% frente a *Radopholus* sp. Puntualmente, algunos autores han reportado porcentajes de mortalidad sobre *Radopholus* sp. de entre 76,4 y 100% con aislados de *Fusarium oxysporum* endófitos (Athman *et al.*, 2006), o del 90% con aislados de *Trichoderma* sp. (Cañizares-Monteros 2003). Mientras que, con *Meloidogyne* sp. se han reportado porcentajes de mortalidad del 100% con un aislado de *P. lilacinus* frente a *M. graminicola* (Gapasin *et al.*, 2011); los anteriores ejemplos son similares a los resultados obtenidos en este trabajo, aunque difieren a lo reportado por Singh y Mathur (2010), quienes obtuvieron un porcentaje de mortalidad del 39% con un aislado de *P. lilacinus* y de 33,8% con uno de *P. chlamydosporia* frente a *M. incognita* tras 24 horas de evaluación y 24 horas de más en la confirmación de mortalidad, un total de 48 horas.

CONCLUSIONES

De los diez aislados evaluados y conforme a las diferencias significativas encontradas, hay varios aislados promisorios en esta investigación, tres de ellos son buenos candidatos con respecto al efecto de su filtrado (Poc01, Pae22 y Pae26), y dos lo son en su uso como hongo (Poc01 y Pae07). Además, los aislados Poc01 y Pae07 presentaron actividad metabólica en los 5 sustratos evaluados, así, estos aislados podrían ser considerados como agentes potenciales de biocontrol contra nematodos de musáceas, aunque harían falta más estudios con el fin de observar el comportamiento de los aislados con otras poblaciones diferentes de nematodos, con plantas o en campo, para que sean integrados a planes de manejo fitosanitario en musáceas. Este tipo de investigación aportan al manejo integrado de plagas agrícolas de una manera sustentable (Al-Ani *et al.*, 2021).

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad de Antioquia por el apoyo en relación con el uso de equipos e infra-

estructura. Así como, al Ministerio de Ciencia Tecnología e Innovación (Minciencias), por el financiamiento del proyecto FP44842-426-2017, "Alternativas agroecológicas (control biológico y extractos vegetales) para el manejo de nematodos en el cultivo de plátano".

REFERENCIAS

- Al-Ani, L. K. T., Aguilar-Marcelino, L., Salazar-Vidal, V. E., Becerra, A. G., & Raza, W. (2021). Role of useful fungi in agriculture sustainability. In *Recent Trends in Mycological Research* (pp. 1-44). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-60659-6_1
- Ali, S. S., & Moharram, A. M. (2014). Biodiversity and enzymatic profile of some entomopathogenic fungi. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences, F. Toxicology & Pest Control*, 6(1), 73-80. <https://doi.org/10.21608/eajbsf.2014.17261>
- Aminuzzaman, F. M., Jahan, S. N., Shammi, J., Mitu, A. I., & Liu, X. Z. (2018). Isolation and screening of fungi associated with eggs and females of root-knot nematodes and their biocontrol potential against *Meloidogyne incognita* in Bangladesh. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 51(5-6), 288-308. <https://doi.org/10.1080/03235408.2018.1472359>
- Aminuzzaman, F. M., Xie, H. Y., Duan, W. J., Sun, B. D., & Liu, X. Z. (2013). Isolation of nematophagous fungi from eggs and females of *Meloidogyne* spp. and evaluation of their biological control potential. *Biocontrol science and technology*, 23(2), 170-182. <https://doi.org/10.1080/09583157.2012.745484>
- Araya, M. (1995). Efecto depresivo de ataques de *Radopholus similis* en banano (*Musa AAA*). *Corbana*, 20(43), 3-6. https://www.researchgate.net/publication/311208027_Efecto_depresivo_de_ataques_de_Radopholus_similis_en_banano_Musa_AAA
- Athman, S. Y., Dubois, T., Viljoen, A., Labuschagne, N., Coyne, D., Ragama, P., Gold, C. S., & Niere, B. (2006). *In vitro* antagonism of endophytic *Fusarium oxysporum* isolates against the burrowing nematode *Radopholus similis*. *Nematology*, 8(4), 627-636. <https://doi.org/10.1163/156854106778613976>
- Barron, G. L. (1977). The nematode destroying fungi. Lancaster, Pennsylvania. USA. Lancaster Press, Inc. 140 p.
- Binh, C. T., Van Tuan, T., Tram, T. B., & Ha, B. T. V. (2019). Determination of protease and chitinase activities from *Paecilomyces variotii* NV01 isolated from

- Dak Lak pepper soil. *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering*, 61(4), 58-63. [https://doi.org/10.31276/VJSTE.61\(4\).58-63](https://doi.org/10.31276/VJSTE.61(4).58-63)
- Bird, A. F. (1968). Changes associated with parasitism in nematodes. III. Ultrastructure of the eggshell, larval cuticle, and contents of the subventral esophageal glands in *Meloidogyne javanica*, with some observations on hatching. *The Journal of Parasitology*, 475-489. <https://doi.org/10.2307/3277069>
- Cañizares-Monteros, C. A. (2003). Estudio sobre poblaciones de hongos endofíticos provenientes de suelos supresivos al nematodo barrenador *Radopholus similis* (Cobb) Thorne en plantaciones comerciales de plátano en la zona de Talamanca, Costa Rica. [Tesis de maestría, CATIE]. <http://repositorio.bibliotecaorton.catie.ac.cr/handle/11554/5562>
- Castillo-Russi, J. D., Araya-Vargas, M., & Patiño-Hoyos, L. F. (2010). Respuesta a la aplicación de nematocida en banano en la zona de Urabá, Colombia. *Agronomía mesoamericana*, 21(2), 307-317. <https://doi.org/10.15517/am.v21i2.4893>
- Castro, R., Álvarez, A., Machado, E., Mendoza, M., Gómez, R., & García, P. (2011). Caracterización de una quitinasa extracelular producida por *Serratia* sp. BIOMI-363706 usando quitina coloidal como sustrato. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 77(2), 101-108. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=371937621002>
- Eapen, S. J., Beena, B., & Ramana, K. V. (2005). Tropical soil microflora of spice-based cropping systems as potential antagonists of root-knot nematodes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 88(3), 218-225. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2005.01.011>
- Esteves, I., Peteira, B., Atkins, S. D., Magan, N., & Kerry, B. (2009). Production of extracellular enzymes by different isolates of *Pochonia chlamydosporia*. *Mycological Research*, 113(8), 867-876. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.04.005>
- FAO. (2004). La economía mundial del banano 1985-2002. Roma. <http://www.fao.org/3/y5102s/y5102s00.htm>
- Gapasin, R. M., Vasquez, E. A., & Rendon, G. A. (2011). Bioassay-guided identification of the nematocidal secondary metabolites from *Paecilomyces lilicanus* for the control of root-knot nematode (*Meloidogyne graminicola*, Golden and Birchfield). *Annals of Tropical Research*, 33(2), 22-43. <https://doi.org/10.32945/atr3322.2011>
- Gray, N. F. (1985). Ecology of nematophagous fungi: effect of soil moisture, organic matter, pH and nematode density on distribution. *Soil Biology and Biochemistry*, 17(4), 499-507. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(85\)90017-3](https://doi.org/10.1016/0038-0717(85)90017-3)
- Guzmán-Piedrahita, Ó. A. (2011). El nematodo barrenador (*Radopholus similis* [Cobb] Thorne) del banano y plátano. *Luna Azul*, (33), 137-153. <http://www.scielo.org.co/pdf/luaz/n33/n33a12.pdf>
- Hankin, L., & Anagnostakis, S. L. (1975). The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*, 67(3), 597-607. <https://doi.org/10.2307/3758395>
- Jenkins, W. R. B. (1964). A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant disease reporter*, 48(9). <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19650801105>
- Kilama, P., Dubois, T., Coyne, D., Niere, B., Gold, C. S., & Adipala, E. (2007). Antagonism of *Paecilomyces* spp. Isolated from Banana (*Musa* spp.) roots and rhizosphere against *Radopholus similis*. *Nematropica*, 215-226. <https://journals.flvc.org/nematropica/article/view/64427>
- Kumar, D., Kumar, L., Nagar, S., Raina, C., Parshad, R., & Gupta, V. K. (2012). Screening, isolation and production of lipase/esterase producing *Bacillus* sp. strain DVL2 and its potential evaluation in esterification and resolution reactions. *Archives of Applied Science Research*, 4(4), 1763-1770.
- Mai, W. F., & Mullin, P. G. 1996. Plant-parasitic nematodes: a pictorial key to genera (No. Ed. 5). Comstock Publishing Associates.
- Medina, P., & Baresi, L. (2007). Rapid identification of gelatin and casein hydrolysis using TCA. *Journal of microbiological methods*, 69(2), 391-393. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.01.005>
- Menjivar-Barahona, R. D. (2005). Estudio del potencial antagonista de hongos endofíticos para el biocontrol del nematodo barrenador *Radopholus similis* en plantaciones de banano en Costa Rica. [Tesis de maestría, CATIE]. <http://www.sidalc.net/repdoc/A0676e/A0676e.pdf>
- Mustafa, U., & Kaur, G. (2009). Extracellular enzyme production in *Metarhizium anisopliae* isolates. *Folia*

- microbiologica*, 54(6), 499-504. <https://doi.org/10.1007/s12223-009-0071-0>
- Ng'ang'a, M. P., Kahangi, E. M., Onguso, J. M., Losenge, T., & Mwaura, P. (2011). Analyses of extra-cellular enzymes production by endophytic fungi isolated from bananas in Kenya. *African Journal of Horticultural Science*, 5. <http://journal.hakenya.net/index.php/ajhs/article/view/73>
- Olivares, B. C. M. (1999). Caracterización biológica y molecular de hongos patógenos de huevos de nematodos [Tesis doctoral, Universitat d'Alacant-Universidad de Alicante]. 312p. <http://rua.ua.es/dspace/handle/10045/3781>
- Ortiz-Paz, R. A., Guzmán-Piedrahita, Ó. A., & Leguizamón-Caycedo, J. (2015). *In vitro* effect of *Purpureocillium lilacinum* (Thom) Luangsa-Ard et al. and *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (Kamyschko ex Barron & Onions) Zare & Gams on the Root-Knot nematodes [*P. chlamydosporia* (Kofoed & White) Chitwood AND *Meloidogyne mayaguensis* Rammh & Hirschmann]. *Boletín Científico. Centro de Museos. Museo de Historia Natural*, 19(2), 154-172. <http://dx.doi.org/10.17151/bccm.2015.19.2.9>
- Seifert, K. A., & Gams, W. (2011). The genera of Hyphomycetes–2011 update. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 27, 119.
- Singh, S., & Mathur, N. (2010). *In vitro* studies of antagonistic fungi against the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Biocontrol Science and Technology*, 20(3), 275-282. <https://doi.org/10.1080/09583150903484318>
- Vergara-Alzate, D., Guzmán, O. A., & Leguizamón-Caycedo, J. (2012). Efecto *in vitro* de *Purpureocillium lilacinum* (Thom) Luangsa, Ard et al. y *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare y Gams sobre el nematodo barrenador *Radopholus similis* (Cobb) Thorne. *Agron*, 20(2), 25-36. [http://agronomia.ucaldas.edu.co/downloads/Agronomia20\(2\)_4.pdf](http://agronomia.ucaldas.edu.co/downloads/Agronomia20(2)_4.pdf)
- Verma, K., & Garg, N. (2018) Detection of Chitinase on Chitin Agar Plates. *IJSR* 8(2). <https://pdfs.semanticscholar.org/4d17/8b3e487cf6e97b85a62881e4a73aa90802f2.pdf>
- Wachira, P. M., Kimenju, J. W., Kiarie, J. W., Kihurani, A. W., & Mwaniki, S. W. (2013). Occurrence and diversity of nematode destroying fungi in banana production zones in Maragua, Kenya. <http://41.204.161.209/handle/11295/66014>
- Wei, B. Q., Xue, Q. Y., Wei, L. H., Niu, D. D., Liu, H. X., Chen, L. F., & Guo, J. H. (2009). A novel screening strategy to identify biocontrol fungi using protease production or chitinase activity against *Meloidogyne* root-knot nematodes. *Biocontrol Science and Technology*, 19(8), 859-870. <https://doi.org/10.1080/09583150903165636>
- Xiang, N., & Lawrence, K. S. (2016). Optimization of *in vitro* techniques for distinguishing between live and dead second stage juveniles of *Heterodera glycines* and *Meloidogyne incognita*. *PLOS ONE*, 11(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154818>