

Efecto de *Paecilomyces lilacinus* en Nemátodos de Vida Libre Asociados a la Rizósfera de Papas Cultivadas en la Región del Cofre de Perote, Veracruz, México

Effect of *Paecilomyces lilacinus* in Free-Living Nematodes to the Rhizosphere Associates Potatoes Grown in the Cofre of Perote Region, Veracruz, Mexico

Gloria Carrión y Damaris Desgarenes, Instituto de Ecología, A.C., Red de Biodiversidad y Sistemática, Instituto de Ecología, A.C., km 2.5 Carretera Antigua a Coatepec 351, Congregación El Haya, Xalapa, Ver., CP91070, México. Correspondencia: gloria.carrion@inecol.edu.mx

(Recibido: Agosto 04, 2011 Aceptado: Octubre 17, 2011)

Carrión G y Desgarenes D. 2012. Efecto de *Paecilomyces lilacinus* en nemátodos de vida libre asociados a la rizósfera de papas cultivadas en la región del Cofre de Perote, Veracruz, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 30:86-90.

Resumen. Se evaluó la mortalidad de nemátodos de vida libre (NVL) inoculados con una cepa de *Paecilomyces lilacinus* (IE-430). Se extrajeron nemátodos de vida libre de muestras de suelo de campos de cultivo de papa. Los NVL fueron escogidos al azar e inoculados (cinco repeticiones, N=500) con una suspensión de esporas de *P. lilacinus*, igual cantidad de NVL fue utilizada en el testigo mantenidos en agua destilada estéril. Con el fin de cuantificar los nemátodos muertos, los individuos fueron observados entre las 12 y 120 h posteriores a la inoculación. Éstos nemátodos se identificaron y colocados en medio de cultivo agar-avena para verificar la presencia de *P. lilacinus*. Se identificaron siete morfotipos de NVL de tres grupos tróficos: bacteriófagos, micófagos y omnívoro-depredadores. A las 48 h se encontró diferencia significativa entre el número de nemátodos muertos en el tratamiento con *P. lilacinus* y el testigo.

Palabras clave adicionales: Hongos nematófagos.

Los nemátodos de vida libre (NVL) participan de manera importante en la descomposición, mineralización y flujo de nutrientes en el suelo, además funcionan como reguladores de poblaciones de hongos y bacterias (Yeates y Bongers, 1999; Lavelle y Spain, 2001). Estos nemátodos pueden funcionar como bioindicadores de la calidad del suelo y ser utilizados para evaluar la restauración del mismo (Bongers y Ferris, 1999; Yeates, 2003). En México, los estudios sobre la nematofauna asociada a la rizósfera de papas cultivadas en la región del Cofre de Perote, tiene registrados a ocho bacteriófagos, tres micófagos, cuatro omnívoros-predadores y dos fitoparásitos (Desgarenes *et al.*, 2009).

Abstract. The mortality of free-living nematodes (FLN) inoculated with a strain of *Paecilomyces lilacinus* (IE-430) was evaluated. FLN were extracted from soil samples from potato fields. The FLN were picked randomly and inoculated (five repetitions, N=500) with spores suspension of *P. lilacinus* and the other a control with the same amount. In order to quantify dead nematodes, individuals were observed for 12-120 h. One part of dead nematodes was identified and other placed in an agar-oatmeal culture medium to verify the presence of *P. lilacinus*. Eight morphotypes of FLN were identified from three trophic groups: bacterial feeders, fungal feeders, and omnivorous-predators. At 48 h significant difference was found between the number of dead nematodes in the *P. lilacinus* treatment and the control.

Additional keywords: Nematofagous fungi.

Résumé. La mortalité des nématodes vivant en liberté (NVL) inoculés avec une souche de *Paecilomyces lilacinus* (IE-430) a été évaluée. Les nématodes vivant en liberté ont été extraits d'échantillons de sol provenant du champ de culture des pommes de terre. Les NVL ont été choisis au hasard et inoculés (cinq répétitions, N = 500) avec une suspension de spores de *P. lilacinus*. Pour le contrôle, a été utilisée une quantité similaire de NVL conservés dans de l'eau distillée stérile. Afin de quantifier les nématodes morts, les individus ont été observés entre 12 et 120 heures. Ces nématodes ont été identifiés et placés dans milieu de culture d'agar-avoine pour vérifier la présence de *P. lilacinus*. Ont été identifiés sept morphotypes de NVL de trois groupes trophiques : les bactériophages, les mycophages et les omnivores-prédateurs. À 48 heures ont été trouvées des différences significatives entre le nombre de nématodes morts dans le traitement avec *P. lilacinus* et le contrôle.

Mots clés supplémentaires: les champignons nématophages.

Dentro de los fitoparásitos registrados, *Globodera rostochiensis* (Heteroderidae: Nematoda) es el de mayor densidad poblacional y por el cual se están probando hongos nematófagos nativos de México como *Paecilomyces lilacinus* para su control. No obstante, poco se sabe sobre el efecto que este hongo pueda tener sobre la nematofauna de vida libre asociada a la rizósfera de papas cultivadas. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar *in vitro* la mortalidad de los NVL de la rizósfera del cultivo de papa en presencia de una cepa de *P. lilacinus*.

En suelos cultivados con papa en la localidad de 'Pescados', Municipio de Perote, fue tomada una muestra compuesta de cinco submuestras de 100 g de suelo cada una. El suelo se extrajo a 15 cm de profundidad siguiendo un patrón zig-zag (Haydock y Perry, 1998). Los nemátodos fueron extraídos por el método de tamizado-centrifugado (s'Jacob y van Bezooijen, 1984). De los nemátodos extraídos, se tomaron al azar 100 individuos y se colocaron en cajas Petri (5 cm de diámetro) con 2 mL de agua destilada (cinco repeticiones, N= 500). Cada caja se inoculó con 1 mL de una suspensión de esporas de *P. lilacinus* preparada a una alta concentración de conidios (10^6 mL⁻¹) para exponer *in vitro* directamente a los nemátodos con el hongo. Se utilizó la cepa de *P. lilacinus* IE-430 nativa del Cofre Perote, aislada de juveniles (J2) de *G. rostochiensis*, reproducida en placas de agar-avena y depositada en el cepario del Instituto de Ecología, A. C. En el testigo también se colocaron 100 nemátodos en cajas Petri con 3 mL de agua destilada estéril (cinco repeticiones, N= 500). Las cajas se mantuvieron a 20±2°C y cada caja fue revisada a las 12, 24, 48, 72, 96 y 120 h para cuantificar el número de nemátodos vivos y muertos.

A las 24 h una parte de los nemátodos muertos del tratamiento con *P. lilacinus* y del testigo, extraídos en cada revisión, se aclaró y se fijó para su determinación a nivel de género y en algunos casos a nivel de especie. Con base en el estudio previamente realizado por Desgarenes *et al.* (2009), fueron determinados aquellos individuos cuyos caracteres morfológicos fueron distinguibles al microscopio, por lo cual no fue posible cuantificar el número de individuos por especie. Se utilizaron claves para los ordenes Dorylaimida (Jairajpuri y Ahmad, 1992), Rhabditida (Andrássy, 1984), Aphelenchida (Hunt, 1993) y Plectida (Holovachov y De Ley, 2006). La otra parte de nemátodos muertos, fue enjuagada dos veces en agua destilada y colocada en blísteres con placas de agar-avena de 1 cm de diámetro (N= 125 nemátodos por tratamiento), antes de ser colocados fueron enjuagados dos veces en agua destilada. Los nemátodos se observaron diariamente para detectar sobre ellos el crecimiento de micelio. Se permitió la esporulación de los hongos crecidos sobre los nemátodos para corroborar la presencia de *Paecilomyces lilacinus* o determinar, al menos a nivel de género, cuando se trató de otros hongos obtenidos de los testigos. Las claves utilizadas para los hongos fueron las de Booth (1971), Ellis (1976), Sutton (1980), Domsch y Gams (1980).

Los datos de mortalidad obtenidos fueron analizados con la prueba ANOVA de Friedman y el Coeficiente de concordancia de Kendall. Además, para cada periodo de

Free-living nematodes (FLN) are significantly involved in the decomposition, mineralization and flow of nutrients in the soil, they also function as fungi and bacteria population regulators (Yeates and Bongers, 1999; Lavelle and Spain, 2001). These nematodes can serve as bio-indicators of soil quality and be used to evaluate their restoration (Bongers and Ferris, 1999; Yeates, 2003). In Mexico, studies on the nematofauna associated with the rhizosphere of potatoes cultivated in the region of Cofre de Perote, have eight registered bacteriophages, three micophages, four omnivore-predators and two phytoparasites (Desgarenes *et al.*, 2009). Within the registered phytoparasites, *Globodera rostochiensis* (Heteroderidae: Nematode) is the one with the highest population, and for whom nematophagous fungi native to Mexico, such as *Paecilomyces lilacinus*, are being tested. Nonetheless, little is known about the effect that this fungi may have on the free-living nematofauna associated to the rhizosphere of cultivated potato. Therefore, the objective of this work was to evaluate *in vitro* the mortality of the FLN (free-living nematofauna) of this rhizosphere in the presence of a *P. lilacinus* strain.

In soils cultivated with potatoes in the village of 'Pescados', in the town of Perote, a composite sample of five 100 g sub-samples of soil was taken. The soil was extracted from a depth of 15 cm in a zig-zag pattern (Haydock and Perry, 1998). The nematodes were extracted via the sieving-centrifugation technique (s'Jacob and van Bezooijen, 1984). Of the extracted nematodes, 100 individuals were taken at random and placed in Petri dishes (5 cm in diameter) with 2 mL of distilled water (five replications, N=500). Each dish was inoculated with 1 mL of a suspension of *P. lilacinus* spores prepared at a high concentration of conidia (10^6 mL⁻¹) to directly expose the nematodes with the fungi *in vitro*. A strain of *P. lilacinus* (IE-430), native to Cofre de Perote was used, isolated from second-stage juveniles (J2) of *Globodera rostochiensis*, reproduced in oatmeal-agar plates and placed in the strain bank of the Ecology Institute (Instituto de Ecología, A.C.). One hundred nematodes were also placed, as the control, in Petri dishes with 3 mL of sterile distilled water (five replications, N=500). The dishes were kept at 20±2°C and each dish was inspected at 12, 24, 48, 72, 96 and 120 h to quantify the number of living and dead nematodes.

Starting at 24 h, from the dead and extracted nematodes in each inspection, both in the treatment with *P. lilacinus* as well as in the control, half were fixed and cleared for later identification at a genus level and, when possible, to the species level. Based on the study previously done by Desgarenes *et al.* (2009), those individuals whose morphological characteristics were distinguishable under the microscope were determined, so it was not possible to quantify the number of individuals per species. Keys were used for the order Dorylaimida (Jairajpuri and Ahmad, 1992), Rhabditida (Andrássy, 1984), Aphelenchida (Hunt, 1993) and Plectida (Holovachov and De Ley, 2006). The other part of the dead nematodes was placed in blister with oatmeal-agar plates, 1 cm in diameter (N=125 nematodes per treatment), before being placed they were rinsed twice in distilled water. The nematodes were observed daily to detect

observación se realizó una prueba de Kruskal-Wallis para determinar diferencias entre los tratamientos para la misma variable. Ambos análisis se realizaron utilizando el paquete estadístico Statistica 8, StatSoft. Los valores promedio van acompañados de su desviación estándar ($\bar{X} \pm DE$).

El número de nemátodos muertos en el tratamiento con *P. lilacinus* y el testigo a las 12 y 24 h fue similar. Sin embargo, a las 48 h se encontró mayor número de nemátodos muertos ($H_{(1, N=10)} = 5.951250$, $P = 0.0147$) en el tratamiento con *P. lilacinus* (Figura 1) que en el testigo (Figura 2). A las 72 h no se encontraron diferencias en la mortalidad promedio de los NVL. Los resultados sugieren que los NVL susceptibles a *P. lilacinus* mueren en las primeras 48 h de

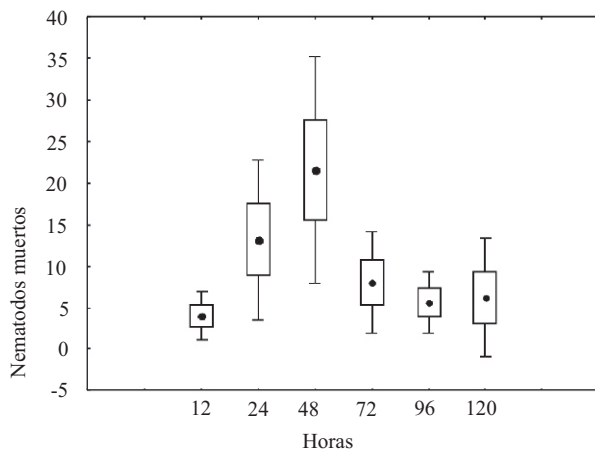


Figura 1. Promedio de nemátodos de vida libre muertos en el tratamiento con *Paecilomyces lilacinus* en las seis observaciones. • Media, □ Media ± Error Estándar, las barras representan la desviación estándar de la media.

Figure 1. Mean dead free-living nematodes in the treatment with *Paecilomyces lilacinus* in the six observations. • Mean, □ Mean ± Standard error, the bars represent the standard deviation of the mean.

exposición al hongo. Dentro de los nemátodos muertos encontrados en este tratamiento, se determinaron tres bacteriofagos (*Cruzinema tripartitum*, *Eucephalobus oxyuroides* y *Steinernema* sp.) un micófago (*Aphelenchoides* sp.) y un omnívoro-depredador (*Crassolabium* sp.) debido a que en algunos ejemplares los caracteres morfológicos fueron indistinguibles (Figura 3 A-B). En el grupo testigo se determinaron cinco bacteriofagos (*Acrobeles* sp., *Cruzinema tripartitum*, *Eucephalobus oxyuroides*, *Plectus* sp. y *Steinernema* sp.) (Figura 3) y un micófago (*Paraphelenchus* sp.). En este experimento se determinaron ocho NVL de los 13 morfotipos de la nematofauna registrada para estas tierras de cultivo (Desgarenes *et al.*, 2009). Ésto podría considerarse una muestra representativa de la nematofauna asociada a la rizósfera de las papas cultivadas en el sitio de estudio, ya que se encontraron los tres grupos tróficos registrados para éstos suelos. Aunque éstos resultados muestran que *P. lilacinus* no afectó drásticamente a los NVL durante el desarrollo del

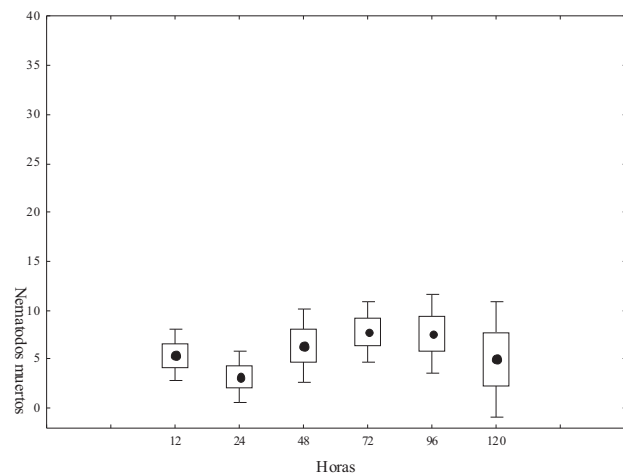


Figura 2. Promedio de nemátodos de vida libre muertos en el testigo en las seis observaciones. • Media, □ Media ± Error estándar, las barras representan la desviación estándar de la media.

Figure 2. Mean dead free-living nematodes in the control in the six observations. • Mean, □ Mean ± Standard error, the bars represent the standard deviation of the mean.

mycelium growth. The sporulation of the fungi grown over the nematodes deposited in the blister was allowed in order to be observed under a microscope to corroborate the presence of *Paecilomyces lilacinus* or determine, at least at a genus level, when it was fungi obtained from the controls. The keys used for the fungi were the ones given by Booth (1971), Ellis (1976), Sutton (1980), Domsch and Gams (1980).

The obtained mortality data was analyzed with Friedman's ANOVA test and Kendall's coefficient of concordance. In addition, a Kruskal-Wallis test was realized for each period of observation to determine the differences between treatments of the same variable. Both analysis were made using the Statistica 8 statistical package from StatSoft. The mean values are accompanied by their standard deviation ($\bar{X} \pm SD$).

The number of dead nematodes in both treatments at 12 and 24 h was similar. However, at 48 h a greater number of dead nematodes ($H_{(1, N=10)} = 5.951250$, $P = 0.0147$) was found in the treatment with *P. lilacinus* (Figure 1) than in the control (Figure 2). After 72 h, once again, no difference in the mean mortality rate was found in the FLN under treatment and the control. Apparently the FLN susceptible to *P. lilacinus* die within 48 h after exposure to the fungi. Among the dead nematodes in the treatment with *P. lilacinus*, it was only possible to determine three bacteriophages (*Cruzinema tripartitum*, *Eucephalobus oxyuroides* and *Steinernema* sp.), one mycophage (*Aphelenchoides* sp.) and one omnivore-predator (*Crassolabium* sp.) due to the fact that in some specimens, the morphological characteristics were indistinguishable (Figure 3 A-B). Five bacteriophages were determined in the control group (*Acrobeles* sp., *Cruzinema tripartitum*,

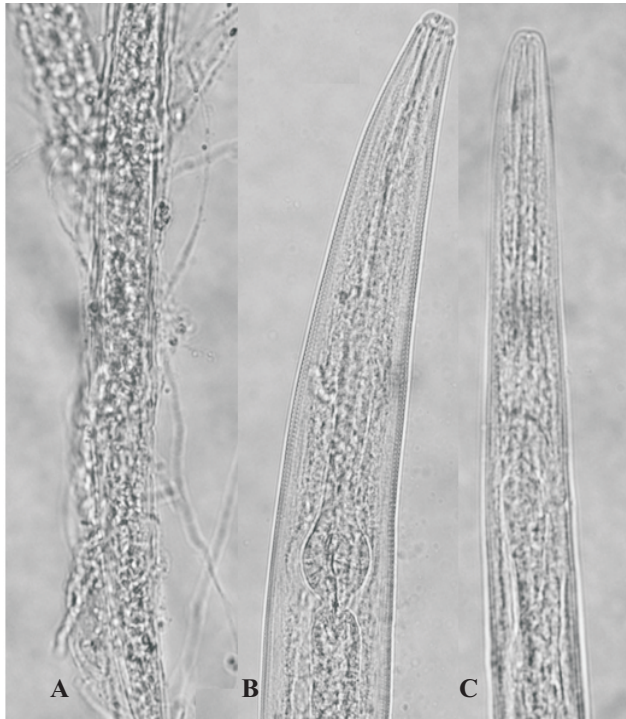


Figura 3. A-B. Nemátodos en el tratamiento con *Paecilomyces lilacinus*; A: Ejemplar con micelio a las 48 h (640X), B: *Plectus* a las 120 h (400X). C. *Steinernema* sp. en el testigo a las 72 h (640X).

Figure 3. A-B. Nematodes in the treatment with *Paecilomyces lilacinus*; A: Specimen with mycelium at 48 h (640X), B: *Plectus* at 120 h (400X). C: *Steinernema* sp. in the control at 72 h (640X).

experimento, algunos nemátodos como *Steinernema* sp. fueron afectados por *P. lilacinus* ya que en las observaciones de las 48, 96 y 120 h se encontraron muertos en el grupo tratado y no en el testigo. Por ello es posible que cepas de hongos nematófagos al interactuar con sus hospedantes presenten cierto grado de especificidad (Mauchline *et al.*, 2004).

Los hongos obtenidos de los nemátodos infectados presentaron micelio y conidióforos de *P. lilacinus*, al cuarto día después de la inoculación en el 44.8% de los nemátodos muertos (56, N=125 nemátodos) y apenas un 0.8% en el testigo (1, N=125). En el testigo, otros hongos fueron encontrados en 16 nemátodos (12.8%): *Cladosporium oxysporum* (2 ejemplares), *Aspergillus* sp. (1), *Fusarium* sp. (3), *Metarhizium* sp. (1), *Penicillium* sp. (2), *Phoma* sp. (5) y *Trichoderma* sp. (2). La presencia de siete hongos en los ejemplares del testigo comparada con el tratamiento con *P. lilacinus* podría deberse a que éste último no permite el desarrollo de otros hongos, ya que germina y desarrolla su micelio con mayor rapidez.

La baja mortalidad de NVL en el tratamiento con el hongo sugiere que la aplicación de cepas de *P. lilacinus* aisladas de la misma zona de estudio, podría ser usadas como agentes de control biológico del nematodo dorado de

Eucephalobus oxyuroides, *Plectus* sp. and *Steinernema* sp.) and one mycophage (*Paraphelenchus* sp.) (Figure 3 C). In this experiment, eight FLN were determined out of the 13 morphotypes of the nematofauna registered for these croplands (Desgarenes *et al.*, 2009). This can be considered a representative sample of the nematofauna associated to the rhizosphere of the potatoes cultivated in the site studied, as all three registered trophic groups registered for these lands were used. Although these results show that *P. lilacinus* did not drastically affect the FLN during the development of the experiment, apparently some nematodes such as *Steinernema* sp. were affected by *P. lilacinus* as seen in the observations at 48, 96 and 120 h in which the nematodes were found dead in the treated group and not in the control. It is possible that strains of nematophagous fungi carry some degree of specificity at the time of interaction with their hosts (Mauchline *et al.*, 2004).

As for the fungi obtained from the nematodes, mycelium and conidiophores of *P. lilacinus* were registered four days after inoculation in 44.8% of the dead nematodes (56, N=125 nematodes) and 0.8 in the control (1, N=125). In the control, other fungi were found in 16 nematodes (12.8%): *Cladosporium oxysporum* (2 specimens), *Aspergillus* sp. (1), *Fusarium* sp. (3), *Metarhizium* sp. (1), *Penicillium* sp. (2), *Phoma* sp. (5) and *Trichoderma* sp. (2). The presence of seven fungi in the specimens of the control compared with that of the treatment with *P. lilacinus* may be due to the latter not allowing the growth of other fungi, as it germinates and develops its mycelium more quickly.

The low mortality of the FLN in the treatment with the fungi indicates that the application of strains of *P. lilacinus* isolated from the same area of study can be used as biological control agents for the golden nematode without representing a risk to free-living nematodes, among others (Hajek, 2007). However, before applying any type of control against plague nematodes such as *Globodera rostochiensis* in the field, it is necessary to study their effect on the population dynamics of FLN.

LITERATURA CITADA

- Andrássy I. 1984. Klasse nematoda (Ordnungen Monhysterida, Desmoscolecida, Araeolaimida, Chromadorida, Rhabditida). Akademie-Verlag. Berlin, Germany. 509 p.
- Booth C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute. Surrey, United Kingdom. 237 p.
- Bongers T and Ferris H. 1999. Nematode community structure as a bioindicator in environmental monitoring. Trends in Ecology and Evolution 14: 224-228.
- Desgarenes D, Sánchez-Nava P, Peña-Santiago R y Carrión G. 2009. Nematofauna asociada a la rizósfera de papas (*Solanum tuberosum*) cultivadas en la zona productora del Cofre de Perote, Veracruz, México. Revista Mexicana de Biodiversidad 80: 611-614.
- Domsch KH and Gams W. 1980. Compendium of soil fungi, Volume 1. Academic Press. London, United Kingdom. 859 p.
- Ellis MB. 1976. More Dematiaceous Hyphomycetes.

la papa sin representar un riesgo para la nematofauna de vida libre, entre otros (Hajek, 2007). Sin embargo, antes de aplicar algún tipo de control contra nemátodos plaga como *G. rostochiensis* en campo, es necesario hacer estudios sobre su efecto en la dinámica de las poblaciones de NVL.

-
- Oxford University Press. Oxford, United Kingdom. 507 p.
- Hajek AE. 2007. Introduction of a fungus into North America for gypsy moth. pp. 53-62. *In*: Vincent C, Goettel MS and Lazarovits G (eds.). Biological Control, a Global Perspective. CAB International, London, United Kingdom. 428 p.
- Haydock PP and Perry JN. 1998. The principles and practice of sampling for the detection of potato cyst nematodes. pp. 61-74. *In*: Marks RJ and Brodie BB (eds.). Potato Cyst Nematodes, Biology, Distribution and Control. CAB International. Wallingford, United Kingdom. 408 p.
- Holovachov O and De Ley P. 2006. Order Plectida. pp. 611-647. *In*: Abebe E, Andrassy I and Traunspurger W (eds.). Freshwater Nematodes: Ecology and Taxonomy. CAB International. Oxford, United Kingdom. 752 p.
- Hunt D. 1993. Aphelenchida, Longidoridae and Trichodoridae: Their Systematics and Bionomics. CAB International. Oxford, United Kingdom. 368 p.
- Jairajpuri MS and Ahmad W. 1992. Dorylaimida free-living, predaceous and plant-parasitic nematodes. Brill Academic Publisher. Leiden, The Netherlands. 458 p.
- Lavelle P and Spain AV. 2001. Soil Ecology. Springer Kluwer Academic. Dordrecht, Germany. 654 p.
- Mauchline TH, Kerry BR and Hirsch PR. 2004. The biocontrol fungus *Pochonia chlamydosporia* shows nematode host preference at the infraspecific level. *Mycological Research* 108: 161-169.
- s'Jacob JJ and van Bezooijen J. 1984. A manual for practical work in nematology. Wageningen University, Wageningen, The Netherlands. 79 p.
- Sosa MC. 1986. Cyst nematodes in Mexico, Central and South America. *Nematologica* 23: 397-398.
- Sutton BC. 1980. The Coelomycetes: Fungi Imperfecti with Pycnidia Acervuli and Stromata. CAB International. United Kingdom. 696 p.
- Yeates GW. 2003. Nematodes as soil indicators: functional and biodiversity aspects. *Biology and Fertility of Soils* 37: 199-210.
- Yeates GW and Bongers T. 1999. Nematode diversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 174: 113-135.
- Yeates GW, Bongers T, De Goede RGM, Freckman DW and Georgieva SS. 1993. Feeding habits in soil nematode families and genera—an outline for soil ecologists. *Journal of Nematology* 25:315-331.