



## Capacidad Nematófaga *in vitro* de *Duddingtonia flagrans* Mantenido en Dos Condiciones de Preservación

JAIME FLORES CRESPO,<sup>1\*</sup> DAVID HERRERA RODRÍGUEZ,<sup>1</sup> RAÚL FLORES-CRESPO,<sup>1</sup> ENRIQUE LIÉBANO HERNÁNDEZ,<sup>1</sup> VÍCTOR VÁZQUEZ PRATS,<sup>1</sup> PEDRO MENDOZA DE GIVES,<sup>1,2</sup> JAVIER ONTIVEROS FERNÁNDEZ<sup>1</sup>

Proyecto Control Biológico, Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, SAGAR, Carr. Fed. Cuernavaca-Cuatla Km. 11.5, Col. Progreso, Jiutepec, Morelos. C.P. 62500 Apartado Postal 206, CIVAC, Morelos.<sup>1</sup>

Department of Entomology/Nematology Rothamsted Experimental Station Harpenden, UK.<sup>2</sup>

\*Autor para la correspondencia: Tel (7) 319-28-48. Fax (7) 320-55-44. E mail floresj@pavet.inifap.conacyt.mx

**ABSTRACT.** One trial was carried out to evaluate the nematophagous capacity of two *Duddingtonia flagrans* cultures, one maintained during one year at laboratory temperature and the other one was a recent culture, twelve Petri dishes with fluor-corn-agar media were seeded with the 1YC another 12 Petri dishes were inoculated with the RC. Both were added with 150 larvae/dish of the free living nematode *Panagrellus redivivus* and 12 fluor-corn-agar dishes only with the free living nematode were used as a control. The results showed that the nematophagous capacity of both cultures were similar but it was statistically different ( $p < 0.05$ ) with respect to the control group. It was concluded that the nematophagous capacity of *D. flagrans* was not affected in spite of being kept one year at laboratory temperature.

**Key Words:** Nematophagous Fungi, Preservation, *Duddingtonia flagrans*, *Panagrellus redivivus*.

**RESUMEN.** Con el objetivo de evaluar la capacidad nematófaga de dos inóculos del hongo *Duddingtonia flagrans*, uno mantenido por un año a temperatura ambiente y otro de una transferencia reciente, se condujo un experimento en el que a 12 cajas de Petri con el inóculo de un año y otras 12 con el inóculo reciente, se les adicionó cinco días después 150 juveniles/caja del nematodo *Panagrellus redivivus* respectivamente, 12 cajas más sin hongo y con juveniles fungieron como testigo. En los tres grupos el medio de cultivo fue harina de maíz agar. Cinco días después de adicionar las larvas se evaluó el porcentaje de depredación en los dos grupos, comparándolos con el testigo. Los resultados indican que la capacidad nematófaga de los dos inóculos fue similar, no habiendo diferencia estadística significativa entre ellos, pero sí con el testigo ( $p < 0.05$ ). Se concluye que la capacidad nematófaga de *D. flagrans* no se afecta si se le conserva almacenada a temperatura ambiente por un año.

**Palabras Clave:** Hongo Nematófago, Conservación, *Duddingtonia flagrans*, *Panagrellus redivivus*.

### INTRODUCCIÓN

En los proyectos de investigación para el desarrollo de métodos sobre control biológico de nematodos gastroentéricos de ruminantes, se requiere el mantenimiento y la preservación de los aislados y cepas de hongos que han demostrado su capacidad nematófaga para ser empleados en los diferentes estudios que se conducen. El mantenimiento de este material biológico se debe tener en los lugares más asépticos que sea posible. Para la preservación de este material se han utilizado diversos sistemas, como la preservación en condiciones ambientales, la refrigeración y la criopreservación.

Algunos investigadores consideran que la capacidad nematófaga de estos hongos puede disminuir o perderse al paso del tiempo o después de periodos prolongados de re-

frigeración, por lo que se recomienda que estos se mantengan activos fisiológicamente en cultivos en suelo.<sup>1</sup> Con objeto de evitar la contaminación de los cultivos de hongos nematófagos se emplea la transferencia (resiembra) periódica de estos, la cual se realiza aproximadamente cada dos meses, lo que implica el frecuente uso de material de laboratorio, así como de considerables cantidades de medio de cultivo, además del esfuerzo y tiempo del personal de laboratorio, con el consiguiente gasto económico.

Uno de los hongos utilizados frecuentemente en el desarrollo de métodos de control biológico es *Duddingtonia flagrans*, el cual ha demostrado en diversos estudios una alta capacidad nematófaga<sup>2,3,4,6</sup> En el proyecto sobre control biológico de nematodos gastroentéricos de ruminantes del Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria del INIFAP, en Jiutepec, More-



los, se practican los sistemas de preservación mencionados, contando por ello con material biológico de cada uno de estos; por lo que, para dilucidar con más precisión la posible alteración que pueda presentarse en este material biológico, se diseñó un experimento cuyo objetivo fue evaluar la capacidad nematófaga *in vitro* de un aislado de *D. flagrans*. Un inóculo fue mantenido a temperatura ambiente por un año, en comparación con otro obtenido de una transferencia reciente, actuando sobre el nematodo de vida libre *Panagrellus redivivus*.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Hongos.** El hongo *D. flagrans* se aisló de una muestra fecal de ovino de una granja localizada en el poblado de Fierro del Toro, municipio de Huitzilac, Morelos, México y se mantuvo en cajas Petri, conteniendo como medio de cultivo agua agar (agar 20 g c.b.p. 1000 ml agua destilada) y se incrementó su biomasa mediante la transferencia de clamidosporas a medio de papa-dextrosa-agar contenido en cajas Petri (papa 200 g + dextrosa 20 g + agar 20 g c. b. p. 1000 ml agua destilada).

Para el desarrollo experimental se utilizaron dos lotes del hongo, un lote se mantuvo almacenado por un año a la temperatura ambiente del laboratorio de Parasitología en Jiutepec, Morelos, México, donde la temperatura media anual es de aproximadamente 26 C. El otro lote se mantuvo con transferencias frecuentes (cada dos meses). La desecación del medio de cultivo se evitó sellando las cajas con Parafilm (American National Can tm. Menasha, WI 54992) y empleando una capa de agar de un grosor de 1 cm, manteniéndose en el laboratorio en un lugar fresco. Este hongo tiene la capacidad de mantenerse vivo por periodos prolongados con un requerimiento mínimo de nutrientes.

**Nematodos.** Se utilizaron 5,400 juveniles del nematodo de vida libre *P. redivivus*, mismo que se mantiene en los siguientes medios de cultivo en cajas Petri: 1, Mezcla de avena (20 g) + agua destilada (10 ml.); 2, Mezcla de harina de arroz (20 g) + agua destilada (10 ml.); 3, Mezcla de

Soya peptona + extracto de hígado.

**Procedimiento.** A partir de los dos lotes de hongos (uno almacenado durante un año a temperatura ambiente y otro obtenido de la transferencia reciente) se sembraron en dos series de 12 cajas Petri cada uno, conteniendo como medio de cultivo harina de maíz agar; una tercera serie de 12 cajas Petri sin el hongo y con el mismo medio de cultivo fungió como testigo. Después de cinco días de haber sembrado los hongos en las cajas de las dos primeras series, se adicionó a cada caja 150 juveniles de *P. redivivus*. Una cantidad igual de nematodos fue adicionada a la serie de cajas del lote testigo. Tabla 1.

Para uniformar los inóculos fungales adicionados a las cajas Petri, se utilizó un sacabocados metálico de 5 mm de diámetro. Se obtuvieron cilindros de agar de ambos cultivos y se depositaron con el micelio correspondiente hacia abajo en el centro de las cajas Petri,<sup>7</sup> lográndose con esto un desarrollo uniforme del hongo a los cinco días.

**Evaluación.** Para evaluar de la capacidad nematófaga a los cinco días en ambos inóculos del hongo, se midieron las siguientes variables: porcentaje de reducción larvaria de cada grupo con respecto al testigo, promedio de larvas/caja, desviación estándar, así como mínimo y máximo de juveniles/caja.

**Análisis estadístico.** Los valores obtenidos más los valores del testigo fueron transformados a la raíz cuadrada de la variable número de larvas + .5, con el fin de cumplir los supuestos de normalidad de los modelos lineales y sometidos a un análisis de varianza (ANDEVA); para ello se utilizó un diseño factorial y las diferencias entre grupos se sometieron a la prueba de Tukey.<sup>5</sup>

## RESULTADOS

Los resultados mostraron que en el grupo del inóculo mantenido a temperatura ambiente por un año, se contabilizaron un total de 11,340 larvas del nematodo, encontrándose estas en 11 de las 12 repeticiones, variando su número entre 240 y 1,740; el porcentaje de depredación varió entre 87.05 y 98.21%; en la repetición número 7, la depredación

Tabla 1. Diseño experimental utilizado en la evaluación de la capacidad nematófaga *in vitro* de dos inóculos de *Duddingtonia flagrans*

Grupo	Hongo	Inóculo	No. De repeticiones	No de juveniles por repetición	Parámetro a evaluar
1	<i>D. flagrans</i>	Reciente	12	150	Porcentaje de depredación del nematodo <i>Pangrellus redivivus</i> cinco días después de que las larvas fueron adicionadas
2	<i>D. flagrans</i>	Almacenado	12	150	
3	Testigo	-----	12	150	

\* Se adicionaron cinco días después de transferidos los inóculos fungales.

fue del 100%; la depredación total del grupo fue de 92.97%.

Con respecto al inóculo proveniente de una transferencia reciente, se contabilizaron un total de 10,920 juveniles del nematodo, encontrándose estas en 10 de las 12 repeticiones, variando su número entre 120 y 4,020; el porcentaje de depredación varió entre 70.09 y 99.11%; en las repeticiones 6 y 7, la depredación fue del 100%; la depredación total del grupo fue de 93.23%.

En el grupo testigo se contabilizaron 196,860 juveniles del nematodo, con un promedio de 16,045 juveniles por caja  $\pm$  3,288. Los juveniles del nematodo en este grupo, se

encontraron en las cajas Petri de las 12 repeticiones, con un mínimo y un máximo de 8,280 y 25,020 respectivamente ( $p < 0.05$ ) Tabla 2, Fig. 1, 2 y 3.

La razón por la cual el número de larvas es muy superior al originalmente adicionado, es porque como se mencionó anteriormente este nematodo se reproduce abundantemente en este medio.

El resultado del análisis estadístico reveló que el inóculo mantenido a temperatura ambiente por un año y el proveniente de una transferencia reciente, se comportaron de manera similar sin presentarse entre ellos diferencia estadística significativa, a diferencia del grupo testigo que fue

Tabla 2. Comparación de la capacidad nematófaga de dos inóculos de *Duddingtonia flagrans* contra *Panagrellus redivivus*

Número de repetición	Grupo 1 <i>D. flagrans</i> FTHO-8 almacenado por un año		Grupo 2 <i>D. flagrans</i> FTHO-8 transferencia reciente		Grupo 3 Testigo
	Número de juveniles	Porcentaje de depredación	Número de juveniles	Porcentaje de depredación	Número de juveniles
1	1,560	88,39	2,580	80,80	13,440
2	1,200	91,07	540	95,98	14,940
3	240	98,21	300	97,77	17,400
4	720	94,64	720	94,64	15,180
5	540	95,98	240	98,21	13,500
6	1,740	87,05	0	100,00	8,280
7	0	100,00	0	100,00	14,400
8	1,440	89,29	1,560	88,39	25,020
9	1,620	87,95	540	95,98	20,640
10	660	95,09	300	97,77	20,580
11	720	94,64	120	99,11	15,960
12	900	93,30	4,020	70,09	17,520
Suma	11,340		10,920		196,860
Mínimo	0		0		8,280
Media	945		910		16,405
Máximo	1,740		4,020		25,020
Desviación	572		1,004		3,288
% Reducción		92,97 <sup>a</sup>		93,23 <sup>a</sup>	<sup>b</sup>

a,b= Literales distintas indican valores estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ).

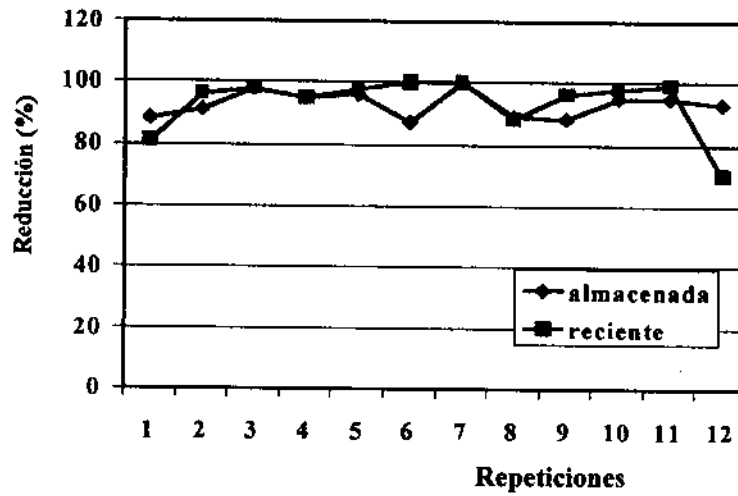


Fig. 1. Porcentaje de reducción del número de *Panagrellus redivivus* en los grupos tratados con *Duddingtonia flagrans* (almacenado durante un año e inóculo reciente) después de 5 días de confrontación

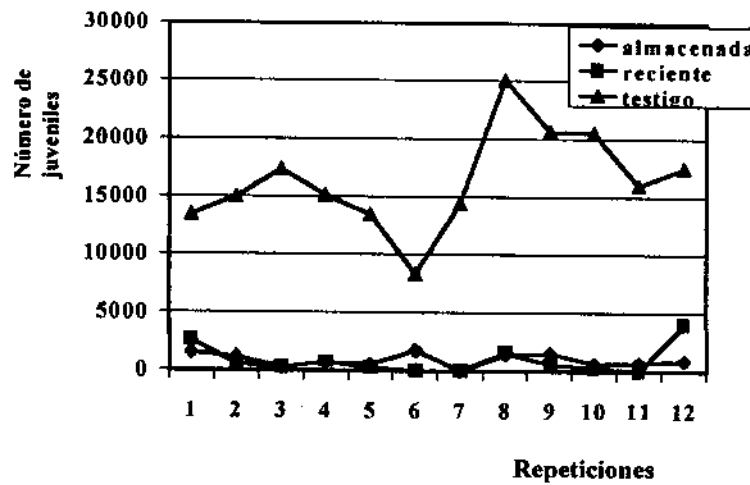


Fig. 2. Número de juveniles de *Panagrellus redivivus* recuperados por repetición en los grupos tratados con *Duddingtonia flagrans* (almacenado durante un año e inóculo reciente) y grupo testigo después de 5 días de confrontación..

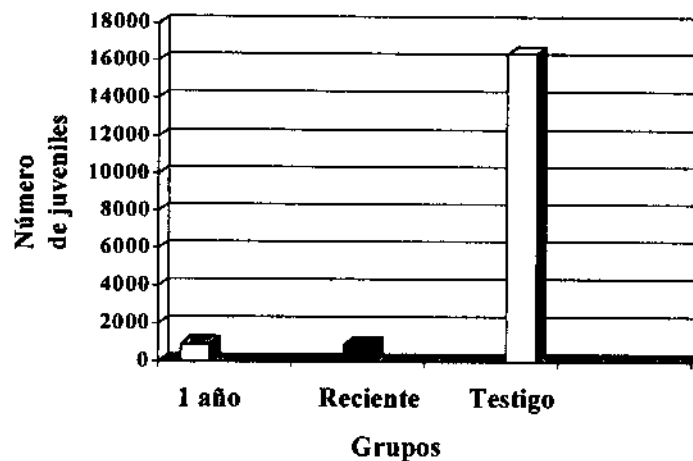


Fig. 3. Promedio de juveniles de *Panagrellus redivivus* recuperados en los grupos tratados con *Duddingtonia flagrans* (almacenado durante un año e inóculo reciente) y grupo testigo después de 5 días de confrontación



altamente significativo frente a estos dos grupos ( $p < 0.05$ ).

## DISCUSIÓN

La capacidad depredadora observada con *D. flagrans* en el presente estudio, fue similar a la señalada por otros autores con aislados de *Arthrobotrys oligospora* contra *P. redivivus*,<sup>8</sup> así como con otros aislados de *D. flagrans* los cuales al ser confrontados contra nematodos de vida libre y parásitos gastrointestinales del ganado mostraron porcentajes de depredación similares a los citados en este trabajo.<sup>7,9</sup>

Los resultados obtenidos en el presente estudio, difieren de aquellos citados por Barron quien señala que la capacidad nematófaga de los hongos se ve disminuida al cabo de algunos meses.<sup>1</sup> De acuerdo a los resultados mostrados en la presente investigación, se concluye que la capacidad nematófaga de *D. flagrans* no es afectada cuando se le mantiene almacenada hasta por un año a temperatura ambiente, por lo que, las transferencias de este material biológico mediante la resiembra de clamidosporas en cajas Petri, no requieren ser efectuadas a intervalos menores de un año, siempre y cuando las condiciones de asepsia sean las adecuadas, además de que se evite la deshidratación del medio de cultivo. Sin embargo, cabe resaltar la conveniencia de evaluar esta capacidad nematófaga comparándola con aislados mantenidos en cultivo en suelo, así como la de continuar con este tipo de estudios, evaluando la capacidad nematófaga a diferentes intervalos y bajo distintos mecanismos de preservación.

El hongo *D. flagrans* posee una alta longevidad bajo condiciones de laboratorio sin perder su capacidad depredadora, puesto que al hacer la comparación de los porcentajes de depredación que se obtuvieron con el hongo almacenado por un año contra el hongo proveniente de una transferencia reciente esta fue similar. Esta característica le confiere un uso potencial en el control biológico de nematodos parásitos de importancia en la producción ganadera.

## REFERENCIAS

1. Barron, G. L. 1977. The Nematode destroying fungi. Topics in Mycobiology, No1 Gueph, Ontario, Canadian Biological Publ. LTD, 140 p.
2. Faedo, M, E. H. Barnés, R. J. Dobson y P. J. Waller. 1998. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: pasture plot study with *Duddingtonia flagrans*. Vet Parasitol 76:129-135.
3. Flores-Crespo, J., D. Herrera, V. Vázquez, J. C. Martínez y P. Mendoza 1999. Acción nematófaga de dos cepas del hongo *Duddingtonia flagrans*. Vet Mex. 30:199-203 .
4. Gronvold, J., P. Nansen, S. A. Henriksen, M. Larsen J. Wolstrup, J. Bresciani, H. Rawat y L. Fribert. 1996. Induction of traps by *Ostertagia ostertagi* larvae, chlamyospore production and growth rate in the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans*. J. Helminthol. 70:291-297.
5. Hurley, D., A. Aguilar, J. Garibay y J. Landeros. 1981. Técnicas de diseño experimental. Pruebas a posteriori. Diferencia mínima significativa. Prueba de Tukey. México D F Departamento de Matemáticas, Centro de Investigación y Estudios Avanzados. Universidad Nacional Autónoma de México. 37-53.
6. Mendoza de G. P., J. Flores-Crespo, D. Herrera, V. Vázquez, E. Liébano y E. Ontiveros. 1998. Biological Control of *Haemonchus contortus* infective larvae in ovine feces by administering an oral suspension of *Duddingtonia flagrans* chlamyospores to sheep. J. Helminthol. 72:343-347.
7. Morgan M., J. M. Behnke, J. A. Lucas y J. F. Peberdy. 1997. *In vitro* assessment to the influence of nutrition temperature and larval density on trapping of the infective larvae of *Heligmosomoides polygyrus* by *Arthrobotrys oligospora*, *Duddingtonia flagrans* and *Monaerosporium megalosporum*. Parasitology 115:303-310.
8. Nansen P., J. Gronvold, A. A. Henriksen y J. Wolstrup. 1986. Predacious activity of the nematode-destroying fungus, *Arthrobotrys oligospora*, on preparasitic larvae of *Cooperia oncophora* and on soil nematodes. Proc. Helminth. Soc. Washington 53:237-243.
9. Waller P. J., M. Larsen, M. Faedo y D. R. Hennessy. 1994. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: *in vitro* and *in vivo* studies. Vet. Parasitol. 51:289-299.