

Capacidad nematófaga de dos cepas del hongo *Duddingtonia flagrans* desarrollada en harina de maíz-agar.

Jaime Flores Crespo*
David herrera Rodríguez*
Víctor Vázquez Prats*
Julio César Martínez Gaytan*
Pedro Mendoza de Gives*

Abstract

The objective of the present study was to evaluate the nematophagous capacity of two *Duddingtonia flagrans* strains: one native from France, and another one from Mexico. Three groups of 17 Petri dishes each containing corn flour-agar media were organized. Each strain was cultured in the dishes of two of the groups; those of the third group served as the control one. Petri dishes of the three groups included 150 *Panagrellus redivivus* larvae/dish. Five days later they were quantified to evaluate larval reduction percentage. Both strains showed significant reductions ($P < 0.05$) as compared with the control group. Mexican and French strains exhibited reductions of 98.9% and 97.7%, respectively.

KEY WORDS: Duddingtonia Flagrans, Panagrellus Redivivus, Chlamydospores, Nematophagous.

Resumen

El objetivo del presente estudio fue evaluar la capacidad nematófaga *in vitro* de dos cepas del hongo *Duddingtonia flagrans*, una cepa de origen francés y la otra nativa de México; con este propósito se formaron tres grupos con 17 cajas Petri cada grupo, utilizándose como medio de cultivo harina de maíz agar. En las cajas de dos de los grupos fue sembrada cada cepa, el tercer grupo sin hongos fungió como testigo; a los tres grupos se les adicionó con 150 larvas de *Panagrellus redivivus*, las cuales fueron extraídas a los cinco días y cuantificadas para valorar con el testigo el porcentaje de reducción larvaria. Al comparar entre sí las cepas y el grupo testigo, se observó que la diferencia fue estadísticamente significativa ($P < 0.05$). La cepa mexicana tuvo un porcentaje de reducción larvaria de 98.9%, mientras que en la cepa francesa éste fue de 97.7%.

PALABRAS CLAVE: Duddingtonia flagrans, Panagrellus Redivivus, Clamidosporas, Nematofaga.

Recibido el 24 de agosto de 1998 y aceptado el 12 de febrero de 1999.

*Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Carretera Cuernavaca-Cuautla, km 11.5, Col. Progreso, 62550, Jiutepec, Morelos, México.

Las parasitosis gastroentéricas de los rumiantes constituyen enfermedades que causan un impacto de consideración a la producción ganadera de México, ya que provocan en los animales daños de diversa magnitud, éstos van desde la pérdida del apetito, susceptibilidad a otras enfermedades, mala conversión alimenticia y baja tasa de fertilidad¹ hasta llegar a causarles la muerte en caso de infecciones agudas.^{2,3,4} El empleo de sustancias químicas antihelmínticas para combatir estas enfermedades, ha sido hasta hoy la práctica más común;⁵ sin embargo, nuevas estrategias de control de estas parasitosis están siendo investigadas con el fin de disminuir los costos de producción que el uso de estos productos implica,^{6,7} además del deterioro ecológico y de la presión selectiva que éstos ejercen en el genoma de los parásitos, seleccionando mutantes altamente resistentes.⁸ Una de estas alternativas es el empleo de hongos nematófagos, los cuales son microorganismos que capturan o invaden nematodos para destruirlos y nutrirse de sus tejidos⁹. Los hongos nematófagos junto con ácaros, virus y bacterias en el suelo constituyen uno de los principales grupos de enemigos naturales de los nematodos.^{10,11} En estudios realizados en Brasil¹², en donde fueron espolvoreados conidios del hongo nematófago *Arthrobotrys* sp en parcelas experimentales infectadas con nematodos gastroentéricos, se observó que después de someter a pastoreo a ovinos libres de nematodos, éstos alcanzaron menores cuentas de huevos de nematodos por gramo de heces y mejor ganancia en peso, con respecto a un grupo testigo pastoreado en parcelas similares a las que no se les adicionó los conidios de este hongo. Del mismo modo, Gronvold *et al.*¹³, en Dinamarca, realizaron un estudio de campo para evaluar el efecto de la adición de conidios de *Arthrobotrys oligospora* en heces de vaca, sobre la reducción de larvas de *Cooperia oncophora* en este sustrato, así como en pasto que rodea al mismo y observaron una reducción de hasta 10 veces el número de larvas de este nematodo en ambos sustratos, comparados con una parcela testigo a la que no se le adicionaron conidios de este hongo. Por otra parte, Gronvold *et al.*,¹⁴ en un estudio similar en el mismo país en los meses de pastoreo, empleando también conidios de *Arthrobotrys oligospora* lograron reducir en pasto alrededor de heces de vaca el número de larvas infectantes de *Ostertagia ostertagi* hasta en 89%. Sin embargo, a pesar de estos primeros éxitos los estudios sobre control biológico de estos parásitos con hongos nematófagos en la ganadería se vieron en un principio limitados, puesto que resultó muy poco práctico e incosteable por las grandes extensiones que tienen los potreros el dispersar los hongos directamente en el suelo y, por otra parte, a que diversos intentos de aplicar a aquéllos por vía oral fracasaron, debido a que las condiciones del tracto gastroentérico de los rumiantes son tan drásticas, que éstas ejercían un efecto letal en los hongos¹⁵ y fácilmente eran degradados y aprovechados por el animal¹¹. En este contexto, las investigaciones se orientaron hacia la búsqueda de cepas de hongos seleccionados, que además

de mostrar actividad nematófaga, fueran capaces de ser resistentes a las condiciones del tracto digestivo de los rumiantes. Del resultado de estas investigaciones se han logrado aislar, entre otros hongos nematófagos, al género *Duddingtonia flagrans*, el cual en diversos estudios después de haber sido administrado por vía oral a ovinos y bovinos, ha mostrado poseer una elevada capacidad de resistencia al paso por el tracto digestivo de éstos¹⁶, al mismo tiempo que ha conservado su habilidad para atrapar y destruir larvas de *Ostertagia ostertagi*, *Haemonchus contortus* y otras larvas de nematodos gastroentéricos en cultivos fecales.^{6,7,11,17,18,19}

En el presente estudio llevado a cabo en el Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, de la Secretaría de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural, se evaluó la capacidad nematófaga de dos cepas del hongo *Duddingtonia flagrans*, la cepa PF, francesa aislada de una muestra de tierra que pertenece a la colección de hongos nematófagos de Rothamsted Experimental Station, Harpenden, United Kingdom y donada al Proyecto de Control Biológico del CENID-PAVET y la FTHO-8, aislada de heces de ovino en Fierro del Toro, municipio de Huitzilac, Morelos, México. Ambas cepas han sido mantenidas en el CENID-PAVET en cajas Petri conteniendo como medio de cultivo agua-agar y reproducidas en forma abundante mediante la transferencia de clamidosporas en cajas Petri conteniendo papa-dextrosa-agar²⁰.

El diseño experimental consistió en sembrar cada una de las cepas del hongo en 17 cajas Petri, conteniendo como medio de cultivo harina de maíz-agar, un tercer grupo de 17 cajas Petri sin hongos y con el mismo medio de cultivo fungió como testigo. Después de cuatro días de haberse sembrado las cepas, a cada una de las 17 cajas de los tres grupos, se les adicionó con 150 larvas de *Panagrellus redivivus*, nematodo de vida libre que se reproduce en este medio en forma abundante y que se cultiva en el CENID-PAVET mediante pases en cajas de Petri conteniendo como medio de cultivo avena y harina de maíz. Doce horas después de que fueron adicionadas las larvas, se observó tanto en las cajas que contenían la cepa PF como en las que contenían la cepa FTHO-8, la formación de una gran cantidad de anillos constrictores, estructuras típicas que este hongo utiliza para atrapar a los nematodos, en las cajas del grupo testigo aparentemente no se observaron cambios significativos. A las 24 horas, en las cajas de los dos grupos que contenían el hongo, se observó una gran cantidad de nematodos atrapados, mientras que en las cajas del grupo testigo, el nematodo se multiplicaba activamente. A las 48 horas, en las cajas de los grupos que contenían el hongo, se observaron prácticamente todos los nematodos atrapados, mientras que en las cajas del grupo testigo se observó una gran cantidad de larvas. Después de cinco días las larvas de todas las cajas de los tres grupos, fueron extraídas del medio de cultivo por el método de Baerman durante 24 horas y cuantificadas en el microscopio compuesto mediante alícuotas con base en un

volumen conocido.

Con el propósito de valorar la capacidad depredadora de las dos cepas de *Duddingtonia flagrans*, se evaluaron las siguientes variables: porcentaje de reducción larvaria con respecto al testigo, promedio de larvas/caja, desviación estándar, mínimo y máximo de larvas/caja.

Los valores obtenidos de cada cepa, 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 Tukey²¹.

Los resultados mostraron que en el grupo de la cepa mexicana FTHO-8, se contabilizaron un total de 300 larvas del nematodo, encontrándose éstas únicamente en las cajas de la repetición 3, 4 y 13, en número de 60, 180 y 60, respectivamente, siendo el porcentaje de reducción larvaria en estas cajas de 98.3, 85.7 y 97.4. En las cajas de las 14 repeticiones restantes, la reducción larvaria fue del 100%, las larvas del nematodo fueron depredadas en su totalidad. Respecto de la cepa francesa PF, se contabilizaron en este grupo 840 larvas de *Panagrellus redivivus*, encontrándose el nematodo en las cajas de la repetición 3, 7, 9, 10, 15 y 16, en número de 60, 60, 300, 60, 60 y 300, respectivamente, siendo en estas cajas

el porcentaje de reducción larvaria de 98.3, 97.3, 79.1, 97.6, 98.8 y 90.5; mientras que en las cajas de las 11 repeticiones restantes la reducción larvaria fue del 100%, las larvas de *Panagrellus redivivus*, fueron depredadas en su totalidad. En el grupo testigo se contabilizaron 74 580 larvas del nematodo, con un promedio de 4 387.06 larvas por caja \pm 2 424.08. Las larvas de *Panagrellus redivivus*, en este grupo, se encontraron en las cajas Petri de las 17 repeticiones, con un mínimo y un máximo de 1 260 a 15 060 ($P < 0.05$), Cuadros 1 y 2.

El resultado del análisis estadístico reveló que las cepas PF francesa y FTHO-8 mexicana se comportaron de una manera similar, no presentándose entre ellas diferencia estadística significativa, a diferencia del grupo testigo que fue altamente significativo contra estos grupos ($P < 0.05$). De acuerdo a los resultados obtenidos en el estudio, las cepas PF francesa y FTHO-8 mexicana tuvieron porcentajes de depredación similares a los mencionados por otros autores^{22,23,24,25,26}, quienes señalan a *D. flagrans* como un hongo con alta capacidad depredadora de nematodos gastroentéricos

Referencias

1. Holmes PH, Coop RL. Pathophysiology of gastrointestinal parasites. Vet Parasitol 1994;54:299-304.

Cuadro 1

COMPARACION DE LA ACTIVIDAD NEMATOFAGA POR REPETICION DE DOS CEPAS DEL HONGO
Duddingtonia flagrans SOBRE EL NEMATODO *Panagrellus redivivus*.
D. flagrans cepa FTHO-8 *D. flagrans* cepa PF

Número de repetición	Total de larvas	% de reducción larvaria	Total de larvas	% de reducción larvaria	Testigo total de larvas
1	0	100.00	0	100.00	1980
2	60	98.31	60	98.31	3540
3	180	85.71	0	100.00	1260
4	0	100.00	0	100.00	15060
5	0	100.00	0	100.00	3780
6	0	100.00	60	97.30	2220
7	0	100.00	0	100.00	3900
8	0	100.00	300	79.17	1440
9	0	100.00	60	97.62	2520
10	0	100.00	0	100.00	10800
11	0	100.00	0	100.00	5040
12	60	97.44	0	100.00	2340
13	0	100.00	0	100.00	4080
14	0	100.00	60	98.82	5100
15	0	100.00	300	90.57	3180
16	0	100.00	0	100.00	1800
17	0	100.00	0	100.00	6540
Suma	300.00	1681.46	840.00	1661.78	74580.00
Media	17.65	98.91 ^a	49.41	97.75 ^a	4387.06 ^b
Desviación	29.07		63.94		2424.08

^{a,b} Literales distintas indican valores estadísticamente significativos ($P < 0.05$).

Cuadro 2

PORCENTAJE DE REDUCCION LARVARIA DE DOS

CEPAS DE *Duddingtonia flagrans* SOBRE *Panagrellus redivivus*.

	Larvas					
	Número total de larvas	Promedio	Mínimo	Máximo	Desviación estandar	% de reducción larvaria
Grupo* <i>Duddingtonia flagrans</i> cepa FTMO-8	300	17.65	0	180.00	99.07	98.91 ^a
<i>Duddingtonia flagrans</i> cepa PF	840	49.41	0	300	63.94	97.75 ^a
Testigo	74 580	4 387.06	1 260	15 060	2 424.08	----- b

^{a,b} Literales distintas indican valores estadísticamente significativos ($P < 0.05$).

* El número de réplicas por grupo fue de 17 cajas.

Referencias

- Holmes, P.H., Coop RL. Pathophysiology of gastrointestinal parasite. *Vet Parasitol* 1994; 54:299-304
- Cheville FN. Introduction to veterinary pathology. Ames (IO): Iowa State University Press, 1988
- Blood DC, Henderson JA, Radostits OM. Medicina veterinaria. 6ª ed. México (DF): Interamericana, 1990.
- Zikes RA. Producción ovina. México (DF): AGT, 1989:331-345.
- Steward TB, Ciordia H, Utley PR. Anthelmintic treatment of subclinical parasitism of feedlot cattle in Georgia. *Am J Vet Res* 1975;36:785-787.
- nematophagous fungi for biocontrol of parasitic nematodes in ruminants. *J Helminthol* 1991;65:193-200.
- Larsen M, Wolstrup J, Henriksen A, Gronvold J, Nansen P. In vivo passage through calves of nematophagous fungi selected for biocontrol of parasitic nematodes. *J Helminthol* 1992;66:137-141.
- Campos RR. Resistencia de *Haemonchus contortus* a los bencimidazoles en ovinos en México (tesis de maestría) México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1989.
- Barron GL. The nematode destroying fungi. Gueph, Ontario, Canadian Biology Publication Ltd., 1977.
- Tribe HT. Prospects for the biological control of plant parasitic nematodes. *Parasitology* 1989;81:619-639.
- Priadko EI, Osipov PP. Trials of nematophagous fungi in field conditions. *Biologicheskaya* 1986;1:30-33.
- Fernández FG, Meireles MCA, Coimbra AM. Biological control of verminosis on ruminant. Abstract 22. Proceedings of the 11th Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology; 1985 August 5-9; Rio de Janeiro, Abstract 22.
- Gronvold J, Wolstrup J, Henriksen SA, Nansen P. Field experiments on the ability of *Arthrobotrys oligospora* (Hyphomycetales) to reduce the number of larvae of *Cooperia oncophora* (Trichostrongilidae) in cow pats and surrounding grass. *J Helminthol* 1987;61:65-71.
- Gronvold J, Nansen P, Henriksen SA, Thylin J, Wolstrup J. The capability of the predacious fungus *Arthrobotrys oligospora* (Hyphomycetales) to reduce numbers of infective larvae of *Ostertagia ostertagi* (Trichostrongylidae) in cow pats and herbage during the grazing season in Denmark. *J Helminthol* 1988;62:271-280.
- Hashmi HA, Connan RM. Biological control of ruminant Trychostrongylids by *Arthrobotrys oligospora* a predacious fungus. *Parasitol Today* 1989;5:28-30.
- Llerandi J, Mendoza de G. Resistance of chlamydospores of nematophagous fungi to the digestive processes of sheep in Mexico. *J Helminthol* 1998;72:155-158.
- Flores CJ, De Mendoza G, Herrera R, Liébano H, Vázquez P, Ontiveros F. Evaluación de la reducción del número de larvas infectantes de *Haemonchus contortus* en heces de ovinos tratados con clamidosporas de *Duddingtonia flagrans*. Memorias del XX Congreso Nacional de Buiatría; 1996 agosto 14-17; Acapulco (Gro) México. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, AC. 1996: 138.
- Mendoza de GP, Flores CJ, Herrera RD, Vázquez PV, Liébano HE, Ontiveros FGE. Biological control of *Haemonchus contortus* infective larvae in ovine feces by administering an oral suspension of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to sheep. *J Helminthol* 1998;72:343-347.

19. Flores CJ, Herrera RD, Vázquez PV, Liébano HE, Mendoza GP. Capacidad depredadora de *Duddingtonia flagrans* y *Arthrobotrys oligospora* sobre larvas infectantes de *Haemonchus contortus*. Memorias del XXI Congreso Nacional de Control Biológico; 1998 noviembre 5-6; Río Bravo (Tamaulipas) México. México (DF): Asociación Mexicana de Control Biológico, 1998:65-69.
20. Ulloa M, Hanlin R. Atlas de micología básica . México (DF): Concepto, 1978.
21. Hurley D, Aguilar A, Garibay J, Landeros J. Técnicas de diseño experimental. Pruebas a posteriori. Diferencia mínima significativa. Prueba de Tukey. México (DF): Departamento de Matemáticas, Centro de Investigación y Estudios Avanzados. Universidad Nacional Autónoma de México, 1981.
22. Morgan M, Behnke JM, Lucas JA, Peberdy JF. 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 *Monacrosporium megalosporum*. *Parasitology* 1997;115:303-310.
23. Henriksen SA, Larsen M, Gronvold J, Nansen P, Wolstrup J. Nematode trapping fungi in biological control of *Dictyocaulus viviparus* *Acta Vet Scand* 1997;38:175-179.
24. Larsen M, Faedo M, Waller PJ, Hennesy DR. The potential of nematofagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: studies with *Duddingtonia flagrans*. *Vet Parasitol* 1998;76:121-128.
25. Faedo M, Barnes EH, Dobson RJ, Waller PJ. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: pasture plot study with *Duddingtonia flagrans*. *Vet Parasitol* 1998;76:129-135.
26. Gronvold J, Nansen P, Henriksen SA, Larsen M, Wolstrup J, Bresciani J, et al. Induction of traps by *Ostertagia ostertagi* larvae, chlamydospore production and growth rate in the nematode- trapping fungus *Duddingtonia flagrans*. *J Helminthol* 1996;70:291-297