

***Purpureocillium lilacinum* LPSC # 876: Producción de conidias en cultivos sobre sustratos sólidos y evaluación de su actividad sobre *Nacobbus aberrans* en plantas de tomate**

Gortari, María C.^{1,2}; Roque A. Hours^{2,3}

¹Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC-PBA); ²Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI; UNLP, CONICET La Plata). Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. Calle 47 y 115, (B1900ASH) La Plata, Argentina; ³hours@biotec.org.ar

Gortari, María C.; Roque A. Hours (2016) *Purpureocillium lilacinum* LPSC # 876: Producción de conidias en cultivos sobre sustratos sólidos y evaluación de su actividad sobre *Nacobbus aberrans* en plantas de tomate. Rev. Fac. Agron. Vol 115 (2): 239-249.

Purpureocillium lilacinum (Thom) Samson (Luangsa-ard et al.) ha sido reportado para el control del fitonematodo *Nacobbus aberrans*. La producción artesanal de hongos biocontroladores se desarrolla sobre sustratos sólidos. Los objetivos del presente trabajo fueron analizar: 1) La producción de conidias de *P. lilacinum* LPSC # 876 cultivado sobre diferentes sustratos sólidos con varias relaciones C/N, y 2) El efecto de algunos productos fermentados conteniendo conidias de *P. lilacinum* sobre la población de *N. aberrans* en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cv. Platense cultivadas en maceta en invernáculo. La producción de conidias fue significativamente diferente entre los sustratos utilizados (granos, afrecho y cáscara de arroz, residuo de girgola, cáscara de langostino y aserrín) siendo mayor sobre afrecho de arroz y en las combinaciones que incluían este sustrato. Los recuentos de conidias más altos (10^{10} conidias/g de producto fermentado) se correspondieron con una relación C/N entre 16:1 y 29:1. Se encontraron diferencias significativas entre tratamientos en el efecto de *P. lilacinum* sobre *N. aberrans*. Las plantas inoculadas con conidias producidas en afrecho de arroz y residuo de girgola mostraron la menor cantidad de agallas, de masas de huevos y de huevos por masa de huevos. Sin embargo, no se evidenció una actividad antagonista concluyente sobre el nematodo. El afrecho de arroz provee los nutrientes necesarios para una buena producción de conidias de *P. lilacinum* aunque su combinación con residuo de girgola mejora la producción. Es necesario rediseñar las estrategias experimentales para demostrar el antagonismo de *P. lilacinum* hacia *N. aberrans*.

Palabras clave: Control biológico. Hongos nematófagos. Nematodos agalladores de la raíz. Fermentación en medio sólido. Residuos agroindustriales.

Gortari, María C.; Roque A. Hours (2016) Conidial production of *Purpureocillium lilacinum* LPSC # 876 on solid substrates. Effect on *Nacobbus aberrans* in tomato plants. Rev. Fac. Agron. Vol 115 (2): 239-249.

Purpureocillium lilacinum (Thom) Samson (Luangsa-ard et al.) has been reported for the control of the root-knot disease caused by *Nacobbus aberrans*. Artisanal production of biocontrol fungal agents is carried out on solid substrates. The objectives of the present work were to analyze: 1) the production of conidia by *P. lilacinum* LPSC # 876 grown on different solid substrates with various C/N ratios, and 2) the effect of some of the fermented products obtained containing *P. lilacinum* conidia on tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cv. Platense (cultivated in pots under greenhouse conditions) inoculated with *N. aberrans*. Conidial production varied depending on the substrates utilized (rice grains, bran and husk, oyster mushroom residue, shrimp shell and sawdust); rice bran (alone or in combination with other substrates) yielded the best results. The maximum conidia production (10^{10} conidia/g of fermented product) corresponded to C/N ratios from 16:1 to 29:1. Significant differences were found on the effect of *P. lilacinum* onto *N. aberrans*. Tomato plants inoculated with conidia produced on rice bran mixed with oyster mushroom residue showed the lowest amount of galls, egg masses and eggs per egg masse. Nevertheless, an antagonistic effect on the nematode was not evidenced clearly. Rice bran contains the necessary nutrients for a good conidial production by *P. lilacinus* although its combination with oyster mushroom residue resulted in higher yields. It is necessary to redesign the experimental strategies to demonstrate the antagonism of *P. lilacinus* onto *N. aberrans*.

Key Words: Biological control. Nematophagous fungi. Root-knot nematodes. Solid-state fermentation. Agricultural residues.

Recibido: 16/06/2015

Aceptado: 28/09/2016

Disponible on line: 15/12/2016

ISSN 0041-8676 - ISSN (on line) 1669-9513, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP, Argentina

INTRODUCCIÓN

Purpureocillium lilacinum (Luangsa-ard et al., 2011), anteriormente *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson, es un hongo natural del suelo. El interés científico por este organismo se debe a su actividad antagónica sobre huevos y hembras de nematodos parásitos de plantas (NPP) (Kiewnick & Sikora, 2006; Lamovsek et al., 2013). En particular, los nematodos agalladores de la raíz afectan un gran número y diversidad de cultivos de importancia generando grandes pérdidas económicas (Lax et al., 2010; Radwan et al., 2012). En Argentina, los géneros más importantes son *Meloidogyne* spp. y *Nacobbus* spp. Ambos inducen la formación de agallas en la raíz dificultando la absorción de agua y nutrientes lo que se traduce en pérdidas productivas que pueden alcanzar la totalidad de los cultivos. Los NPP suelen ser un factor limitante en la producción de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Su incidencia se incrementó en los últimos años fundamentalmente en los cultivos bajo invernadero (Argerich & Troilo, 2011). El control de esta plaga se basa en el uso de desinfectantes de suelo (i.e. bromuro de metilo) y nematocidas químicos. Sin embargo, la prohibición del bromuro de metilo para el año 2015 (Valero, 2009), la aparición de resistencia, la presión social por el acceso a alimentos más saludables y por el cuidado del ambiente han llevado a la búsqueda de medidas alternativas de control. Una opción en este sentido es el control biológico (CB) mediante la utilización de microorganismos vivos y/o productos derivados de ellos.

El suelo es un ecosistema complejo en el que se suceden múltiples interacciones, tanto positivas como negativas, entre diferentes especies. El CB se basa en la explotación de esta red de interacciones, particularmente de las negativas entre microorganismos y organismos superiores para evitar y/o disminuir el efecto de las plagas en los cultivos (Lamovsek et al., 2013). Entre otros organismos, los hongos son importantes debido a la facilidad que ofrecen respecto de su aislamiento, producción masiva y formulación además de su importante rol en el manejo de plagas hortícolas (FUNICA, 2009; Brand et al., 2010). En varios países se utilizan diferentes formulaciones de *P. lilacinum* como parte de las estrategias del manejo integrado de plagas por su actividad biológica contra los NPP, la facilidad para ser producido *in vitro* y la falta de efectos adversos para el ambiente y/o otros seres vivos (Kiewnick & Sikora, 2006). *P. lilacinum* no es estrictamente un hongo nematófago sino un parásito oportunista que infecta, coloniza y consume estructuras reproductivas de los nematodos de la raíz en estadios sedentarios de su ciclo de vida. Se ha demostrado que *P. lilacinum* LPSC # 876 tiene efecto *in vitro* sobre *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne & Allen, 1944 (Gortari & Hours, 2014). Sin embargo, su presencia en el suelo no garantiza un control eficiente de los NPP, siendo necesario hacer múltiples aplicaciones con conidias viables, virulentas y resistentes (Sung & Liu, 2006).

Los cultivos sobre sustratos sólidos son, con frecuencia, el mejor método de obtención de conidias. Las conidias aéreas producidas por este método son superiores a aquellas producidas en medio líquido

(Holland et al., 2002; Hölker et al., 2004; Brand et al., 2010; Gao & Liu, 2010). Diferentes aspectos son determinantes en la adopción de una tecnología para el manejo de plagas. Entre ellos, la posibilidad de contar con métodos de producción masiva de conidias de calidad así como la de poder ser implementada por los propios productores (FUNICA, 2009; Sivila & Alvarez, 2013). En este sentido, es importante considerar la utilización de productos, subproductos o residuos agroindustriales regionales como sustratos para su producción (Mussatto et al., 2012), particularmente aquellos que no posean un significativo valor alimenticio como tales. El arroz es uno de los sustratos más utilizados y el que ha dado mejores recuentos. También se han evaluado otros materiales con diferentes valores comerciales tales como: granos de cebada, trigo, maíz y sorgo, salvado de trigo y de arroz, torta de soja, cáscara de soja y de café, etc. (Brand et al., 2004; Gulsar Banu et al., 2006; Robl et al., 2009; Amala et al., 2012; Mar & Lumyong, 2012). En este sentido, resulta conveniente el uso de residuos agroindustriales, que no formen parte de cadenas alimenticias, como sustrato dado su menor (o nulo) valor comercial de modo de contribuir a un mejor y más completo aprovechamiento de la materia prima de la cual proviene.

Los objetivos de este trabajo fueron estudiar: 1) la producción de conidias de *P. lilacinum* sobre diferentes sustratos sólidos de origen agroindustrial con distintas relaciones C/N, y 2) el efecto de las conidias de *P. lilacinum*, producidas en algunos sustratos seleccionados, sobre la población de *N. aberrans* en plantas de tomate cv. Platense cultivadas en maceta bajo condiciones de invernáculo.

METODOLOGÍA

Microorganismos, cultivo e inóculo

Se utilizó *P. lilacinum* LPSC # 876 aislado previamente en La Plata (Buenos Aires) (Gortari et al., 2007). El hongo se cultivó en agar papa glucosado (APG, Britania) a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 10 días. Las conidias se resuspendieron en Tween 80 (0,1%) y su concentración se determinó por recuento en cámara de Neubauer.

Los ejemplares de *N. aberrans* utilizados provinieron de muestras de suelo de cultivos de tomate cv. Elpida F1® (Syngenta AG, Switzerland) de la Estación Experimental Ing. Agr. Julio Hirschhörn de la Fac. de Cs. Agrarias y Forestales (FCAYF) de la Universidad Nacional de La Plata. Su mantenimiento y multiplicación se llevó a cabo en plantas de tomate cv. Platense en macetas bajo condiciones de invernáculo. La suspensión de huevos se obtuvo disgregando las masas de huevos (MH) con una solución de NaOCl al 1% y posterior lavado (5 veces) con agua destilada estéril. El recuento se hizo bajo microscopio estereoscópico (450 X).

Sustratos

Se evaluaron 6 sustratos sólidos: granos de arroz entero sin pelar (AE), afrecho de arroz (AA), cáscara de arroz (CA), residuo de la producción de *Pleurotus ostreatus* (RP), residuo de cáscara de langostino (RL) y aserrín de salicáceas (A). El AE, AA y CA, proporcionados por la Estación Experimental Ing. Agr.

Julio Hirschhörn, fueron utilizados sin tratamiento previo. Los sustratos RP y RL fueron suministrados por un establecimiento productor (La Plata) y por el INTI-Mar del Plata, respectivamente. Ambos fueron secados en estufa (50°C), molidos y tamizados, utilizándose la fracción comprendida entre 0,8 a 2 mm. El A fue obtenido en aserraderos de Berisso (Provincia de Buenos Aires), secado a temperatura ambiente y usado sin tratamiento adicional. En todos los casos, se determinó el contenido en materia orgánica, carbono, nitrógeno total y cenizas (Lab. de Edafología, FCAyF, UNLP).

Cultivo sobre sustrato sólido

En los primeros ensayos se utilizaron cajas de Petri (60 x 15 mm) conteniendo 2 g de cada sustrato, humedecido con agua destilada y esterilizadas en autoclave a 121°C por 20 min. Luego las cajas se inocularon con 1 ml de una suspensión de conidias de modo de alcanzar una concentración de 1×10^7 conidias/g de sustrato húmedo y una humedad inicial del 60%. La incubación se realizó por 10 días a $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Posteriormente se evaluaron combinaciones de dos sustratos en las siguientes proporciones (expresadas en porcentajes): 100:0, 75:25, 50:50, 25:75, 0:100 bajo las mismas condiciones de inoculación y cultivo antes descritas. En función de los resultados obtenidos se produjeron conidias a los efectos de evaluar su interacción con *N. aberrans* en plantas de tomate cultivadas en invernáculo. Para ello, se utilizaron 5 g de cada mezcla de sustratos previamente seleccionados (conteniendo 75% de AA y 25% de AE, CA, RP, RL o A) bajo las mismas condiciones de inoculación y cultivo antes descritas.

Evaluación de los cultivos

El material fermentado obtenido al final de cada cultivo se homogeneizó cuidadosamente, se tomó una muestra de 1 g y se le añadieron 9 ml de una suspensión de Tween 80 (0,1%). Después de agitar durante 15 min se filtró mediante tela serigráfica (150 hilos/cm²) y se realizaron las diluciones necesarias. El recuento se hizo en cámara de Neubauer y se calculó el número de conidias/g de material fermentado. El porcentaje (%) de germinación se determinó sobre una alícuota de 10 µl de la suspensión de conidias convenientemente diluida (ca. 10^6 conidias/ml), sembrada en agar agua (al 1%) con posterior incubación en cámara húmeda (15-18 h a $28 \pm 1^\circ\text{C}$). La proporción de conidias germinadas (aquellas cuyo tubo germinativo es al menos 2 veces el diámetro de la conidia) se calculó por observación y recuento microscópico (400 X).

Determinación de la actividad antagónica de *P. lilacinum*

Se efectuaron diferentes tratamientos (T) según se detalla en la Tabla 1. Los tratamientos T1 a T5 fueron inoculados con conidias producidas sobre diferentes mezclas de sustratos y con *N. aberrans*, T6 fue inoculado sólo con *N. aberrans* y T7 no fue inoculado (sin hongo ni nematodo, control). Por cada tratamiento se realizaron 3 réplicas, utilizándose un total de 21 macetas plásticas N° 16 (Ø = 16 cm, altura = 17cm, capacidad 3 l), cada una de ellas conteniendo aproximadamente 1,5 kg de una mezcla de tierra negra

y sustrato orgánico (HI-SOIL®) en relación 1:1. Esta mezcla fue previamente esterilizada durante 1 h a 120°C (2 veces con un intervalo de 24 h). A cada maceta se trasplantó una plántula de tomate cv. Platense de 1 mes de crecimiento obtenida en el laboratorio bajo condiciones de invernáculo. En simultáneo con el transplante, 3 macetas/sustrato se inocularon con 1 g de producto fermentado según se detalla en la Tabla 1 (Anastasiadis et al., 2008). Una semana después, las 15 plantas de los tratamientos T1 a T5 fueron reinoculadas con con 1 g del correspondiente producto fermentado, y las 18 plantas de los tratamientos T1 a T6 fueron inoculadas con aproximadamente 3.300 huevos y 90 larvas de *N. aberrans*/planta obtenidos de raíces de plantas de tomate infectadas experimentalmente. A los 55 días las plantas se removieron de las macetas para evaluar parámetros relacionados con: a) el desarrollo del vegetal fresco: longitud y peso tanto de la parte aérea como de la raíz; b) la densidad poblacional de *N. aberrans*: número de agallas/raíz e índice de agallamiento (IA), número de masas de huevos/raíz (MH/raíz) y número de huevos/MH (H/MH) y c) la colonización fúngica: número de unidades formadoras de colonias (ufc) de *P. lilacinum*/g raíz y ufc de *P. lilacinum*/huevos de *N. aberrans*. El IA se estimó según la escala de Hartman y Sasser (1985, citado por Lax et al. (2010)): 0 = sin agallas, 1 = 1-2, 2 = 3-10, 3 = 11-30, 4 = 31-100 y 5 = más de 100. Para evaluar la presencia de *P. lilacinum* en el sistema radicular las raíces se cortaron en secciones de 1 cm de longitud. Se tomó una submuestra de 1 g de raíz/tratamiento, se colocó en 9 ml de una solución estéril de cloranfenicol (0,5 g/l), se agitó durante 10 min y finalmente se sembraron 200 µl de una dilución 10^{-3} en cajas de Petri con APG. La colonización fúngica de los huevos de *N. aberrans* se evaluó de modo similar. Las placas se incubaron a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ y se observaron diariamente para registrar la aparición de colonias fúngicas.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los ensayos se realizó con el software estadístico Infostat (Di Rienzo et al., 2008). Se aplicó el análisis de la varianza y el test de comparaciones múltiples de Fischer previa transformación logarítmica de las variables que no evidencian distribución normal. Los datos mostrados son promedio de triplicados \pm SD.

RESULTADOS

Los diferentes sustratos utilizados en la formulación de los medios de cultivo sólidos para el desarrollo y conidiogénesis de *P. lilacinum* fueron caracterizados con respecto a los principales parámetros que condicionan el crecimiento fúngico. Los resultados de dicha caracterización se muestran en la Tabla 2. Las características de los residuos agroindustriales son muy variadas y dependen de la materia prima y del proceso del cual provienen. En general, los valores hallados en nuestro caso son concordantes con los consignados por la bibliografía para el mismo tipo de material y los mismos parámetros (Rodríguez Almarza, 2007;

Tabla 1. Diseño experimental para la determinación de la actividad antagónica de *P. lilacinum* en plantas de tomate cultivadas en maceta bajo condiciones de invernáculo. AA: afrecho de arroz. AE: arroz entero. CA: cáscara de arroz. RP: residuo de *Pleurotus*. RL: residuo de langostino. A: aserrín de salicáceas.

Tratamiento	Componentes
T1	Conidias de <i>P. lilacinum</i> producidas sobre AA/AE (75/25) + inóculo de <i>N. aberrans</i>
T2	Conidias de <i>P. lilacinum</i> producidas sobre AA/CA (75/25) + inóculo de <i>N. aberrans</i>
T3	Conidias de <i>P. lilacinum</i> producidas sobre AA/RP (75/25) + inóculo de <i>N. aberrans</i>
T4	Conidias de <i>P. lilacinum</i> producidas sobre AA/RL (75/25) + inóculo de <i>N. aberrans</i>
T5	Conidias de <i>P. lilacinum</i> producidas sobre AA/A (75/25) + inóculo de <i>N. aberrans</i>
T6	Inóculo de <i>N. aberrans</i>
T7	Control (sin <i>P. lilacinum</i> , sin <i>N. aberrans</i>)

Tabla 2. Caracterización química de los sustratos utilizados. ¹. Materia orgánica, obtenida por diferencia en calcinación con mufla a 450°C; ². Carbono fácilmente oxidable, método de Walkley-Black; ³. Nitrógeno total. Digestión húmeda, evaluación por el método de Micro-Kjeldahl; ⁴. Cenizas, calcinación con mufla a 450°C.

Sustrato	Parámetro				
	MO ¹ (mg)	C ² (%)	Nt ³ (%)	Cenizas ⁴ (mg)	Relación C/N
Arroz Entero	93,4	31,8	1,309	6,6	24,3
Cáscara de arroz	80,2	8,9	0,268	19,8	33,3
Afrecho de arroz	90,4	40,5	2,479	9,6	16,3
Residuo de <i>Pleurotus</i>	80,5	35,0	0,737	19,5	47,5
Residuo de langostino	69,8	19,6	7,332	30,2	2,7
Aserrín de salicáceas	98,8	35,9	0,140	1,2	256,4

Pincirolí, 2010; Martínez & Roca, 2011). En el caso del RP es necesario aclarar que se trata de un residuo complejo cuya composición varía dependiendo de los elementos que conforman el sustrato donde desarrolla y fructifica el *P. ostreatus*. En nuestro caso, la materia prima base que dio origen al RP utilizado fue paja de avena con inóculo semilla de *Pleurotus* sobre granos de sorgo (Rodríguez, 2007; Colavolpe et al., 2012). La composición del RL empleado, compuesto por cáscaras y peladuras propias del exoesqueleto de langostino, es característica de la especie predominante en nuestro país (INIDEP, 2015).

La primera serie de cultivos, empleando los diferentes sustratos evaluados individualmente, arrojó diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en la producción de conidias. El AA y el RL fueron los sustratos de mayor ($1,79 \times 10^{10}$ conidias/g) y menor ($9,0 \times 10^7$ conidias/g) recuento, respectivamente (Figura 1), con un % de germinación en todos los casos de $\approx 85-90\%$ a las 18 h y cercano al 100% a las 24 h.

En la segunda serie de cultivos, empleando combinaciones de sustratos, se observó que el mayor recuento fue para las mezclas que incluían AA y el menor para las de RL con AE y A. El número de conidias más alto se obtuvo con la mezcla AA/RP (75/25) alcanzando un valor promedio de $2,23 \times 10^{10}$ conidias/g en tanto que el más bajo correspondió a la mezcla RL/A (75/25) con un valor promedio $4,00 \times 10^6$ conidias/g. Los valores de recuento de conidias por

gramo de producto fermentado asociados a cada sustrato como así también a las diferentes combinaciones ensayadas se muestran en la Figura 2.

La relación C/N obtenida con los diferentes sustratos y los correspondientes valores de conidias obtenidas por gramo de producto fermentado se muestran en la Figura 3.

En el ensayo de actividad de las conidias sobre la población de *N. aberrans* se partió de inóculos con recuentos comprendidos en el rango $6,85 \times 10^9$ (AA/RL) a $2,10 \times 10^{10}$ (AA/RP) conidias por gramo de producto fermentado, con un % de germinación entre 87% (AA/AE) y 100% (AA/CA) a las 18 h y superando el 95% en todos los casos a las 24 h. A los 55 días *P. lilacinum* se encontró en las raíces de las plantas de los tratamientos T1, T2, T3 y T5 (10^3 ufc/g raíz) pero no colonizó huevos de *N. aberrans*.

Los parámetros de crecimiento evaluados (longitud y peso) de parte aérea como de raíz de las plantas de tomate sometidas a los diferentes tratamientos (T1 a T7) se muestran en la Figura 4.

Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) para los parámetros relacionados con el desarrollo vegetal. Las plantas inoculadas con *N. aberrans* tuvieron una disminución de la longitud (32,5%) y del peso (40,5%) de la parte aérea respecto del T7 (control) y diferencias no significativas ($p > 0,05$) respecto de la longitud y peso de la raíz. La longitud promedio del tallo fue mayor para el T7 (control) con 74 cm disminuyendo hasta un

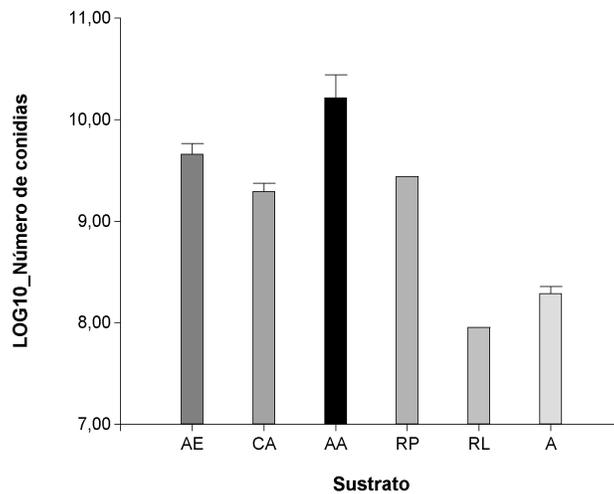


Figura 1. Producción de conidias de *P. lilacinum* en cultivo sobre sustrato sólido empleando diferentes sustratos. AE: arroz entero. CA: cáscara de arroz. AA: afrecho de arroz. RP: residuo de *Pleurotus*. RL: residuo de langostino. A: aserrín de salicáceas.

mínimo de 45 cm en el T3 con valores intermedios el siguiente orden: T2, T1, T5, T6 y T4. Para la variable peso de la parte aérea, el mayor peso promedio fue para el T7 (control): 37 g con valores menores hasta 19 g según el siguiente orden: T5, T1, T4, T2, T6 y T3. En cambio, el mayor peso promedio de la raíz fue para el T1 (17 g) seguido de T4, T5, T7, T2, T6 y T3 (10 g). Para la longitud de la raíz el mayor (24 cm) y el menor valor (16 cm) correspondieron a T1 y T3, respectivamente, con valores intermedios el siguiente orden: T2, T7, T5, T6 y T4. En general, las plantas con menor desarrollo correspondieron al T3 (nematodo más *P. lilacinum* cultivado sobre RP).

También se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto de las variables relacionadas con la población de nematodos (Figura 5). Las plantas del T7 (control) no tuvieron síntomas de infección. El número de agallas promedio fue más bajo en el T3 (12), seguido del T5, T1, T4 y T6 con valores intermedios y T2 con el mayor valor (37). El IA tuvo un patrón semejante al número de agallas, con valores comprendidos entre 2,33 y 3,66 para el T3 y T2, respectivamente. El número de masas de huevos promedio fue menor para el T3 (7) seguido del T5, T1, T4, T6 y T2. El número promedio de huevos/masa de huevos fue menor para el T3 (67) seguido de T5, T1, T2, T6 y T4 (308). En general, las plantas que evidenciaron valores más bajos respecto de los parámetros indicativos de la infección parasitaria correspondieron al T3 (nematodo más *P. lilacinum* cultivado sobre RP).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Diversas investigaciones sostienen que la fermentación sobre sustrato sólido (FSS) es uno de los mejores métodos para la obtención de conidias de calidad para el CB (Holker et al., 2004; Brand et al., 2010). Sin

embargo, la conidiogénesis difiere significativamente entre las especies fúngicas así como con los diferentes sustratos utilizados para su crecimiento y reproducción. Incluso, se reportan requerimientos nutricionales dependientes de cepas particulares (Sun & Liu, 2006; Mar & Lumyong, 2012). En nuestra experiencia, el crecimiento de *P. lilacinum* fue adecuado en casi todos los sustratos excepto en RL. *P. lilacinum* no creció en el RL; sin embargo, permaneció viable ya que fue recuperado a partir del material fermentado luego de sembrado e incubado sobre cajas de Petri con APG. En base a las observaciones de otros investigadores la falta de crecimiento en el residuo de langostino podría deberse a la incapacidad de *P. lilacinum* para utilizar la quitina natural como fuente de C (De Araujo et al., 2009). Cuando al RL se le agregó 75% de AA llegó a producir en el orden de 10^9 conidios/g de sustrato. En los sustratos individuales el mayor recuento se obtuvo con AA seguido de AE, CA, RP y A. Villalba et al. (2009) compararon diferentes sustratos, tales como polvo (harina) de arroz, de maíz y de sorgo, mezclados en diferentes proporciones con viruta y aserrín (soportes) para la producción de conidias de *Beauveria bassiana*. Los mejores recuentos fueron obtenidos con el sustrato polvo de arroz. Sin embargo, observaron una disminución al aumentar la proporción de sustrato. Los investigadores atribuyeron esta observación a la aglutinación de las partículas y disminución de la superficie aprovechable por el hongo. Amala et al. (2012) encontraron resultados similares respecto del AA comparado con diferentes residuos agroindustriales de origen vegetal. El número de conidias obtenido fue atribuido al alto contenido nutricional del AA. El AA, un subproducto del procesamiento del arroz, contiene un 11-15% de proteínas, un 34 a 46% de extracto no nitrogenado (principalmente almidón), un 10-20% de lípidos y bajo contenido en fibra y cenizas lo que lo convierte en un buen componente para medios de cultivo para hongos filamentosos.

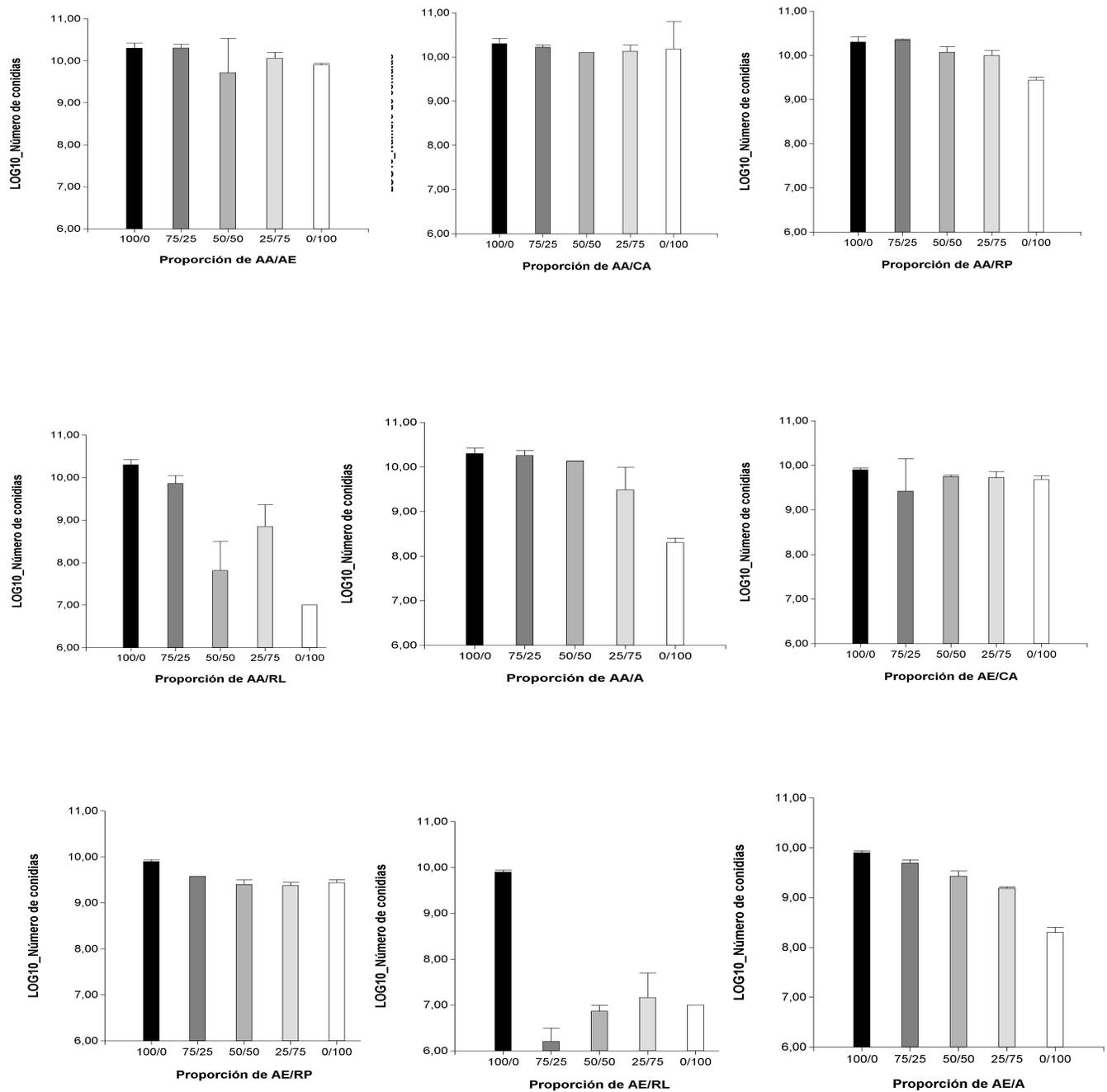


Figura 2. Producción de conidias de *P. lilacinum* en cultivo sobre sustrato sólido empleando diferentes sustratos-mezcla. AE: arroz entero. CA: cáscara de arroz. AA: afrecho de arroz. RP: residuo de *Pleurotus*. RL: residuo de langostino. A: aserrín de salicáceas.

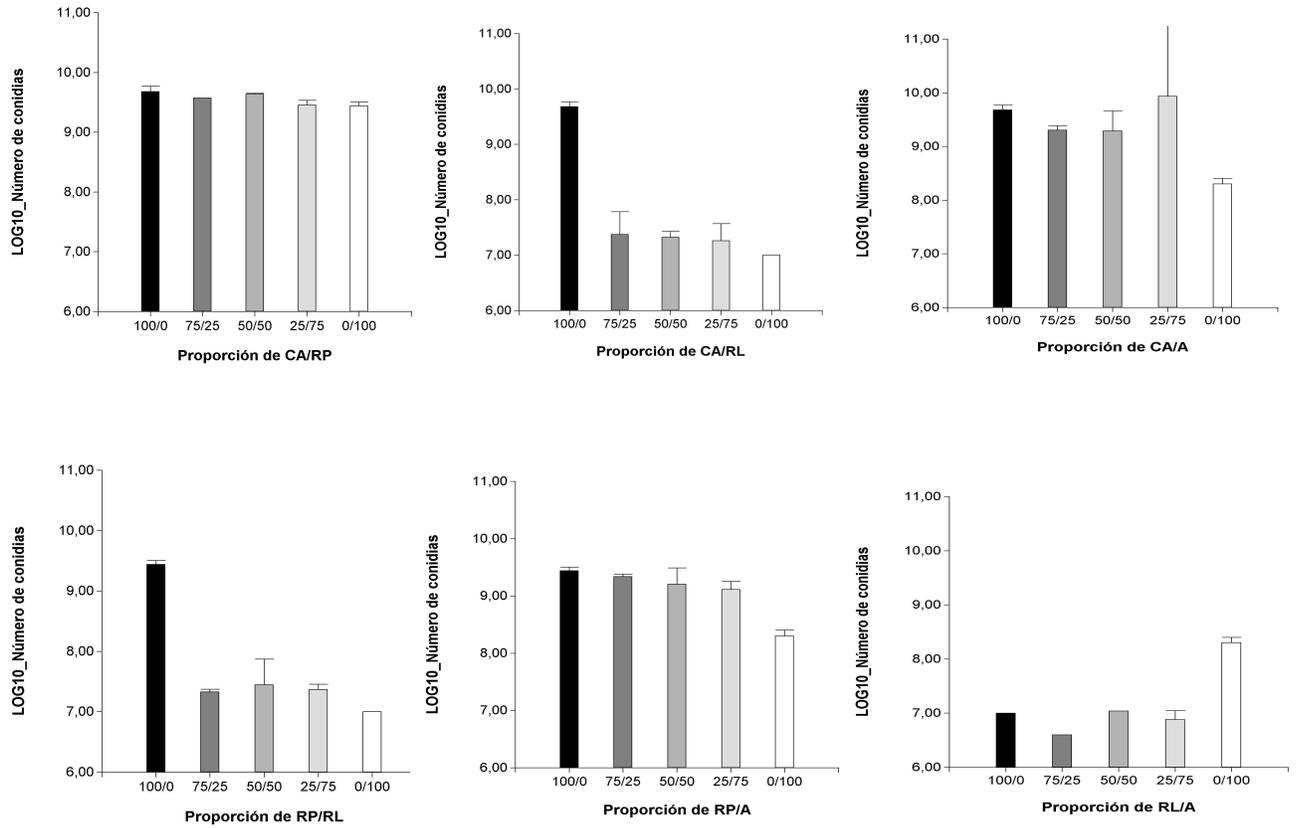


Figura 2 (continuación). Producción de conidias de *P. lilacinum* en cultivo sobre sustrato sólido empleando diferentes sustratos-mezcla. AE: arroz entero. CA: cáscara de arroz. AA: afrecho de arroz. RP: residuo de *Pleurotus*. RL: residuo de langostino. A: aserrín de salicáceas.

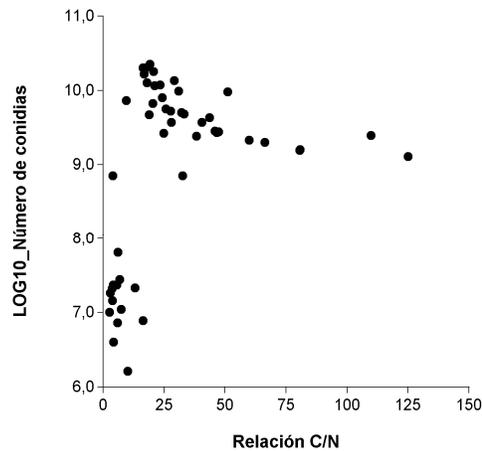


Figura 3. Producción de conidias de *P. lilacinum* en cultivos sólidos en función de la relación C/N para los diferentes sustratos empleados.

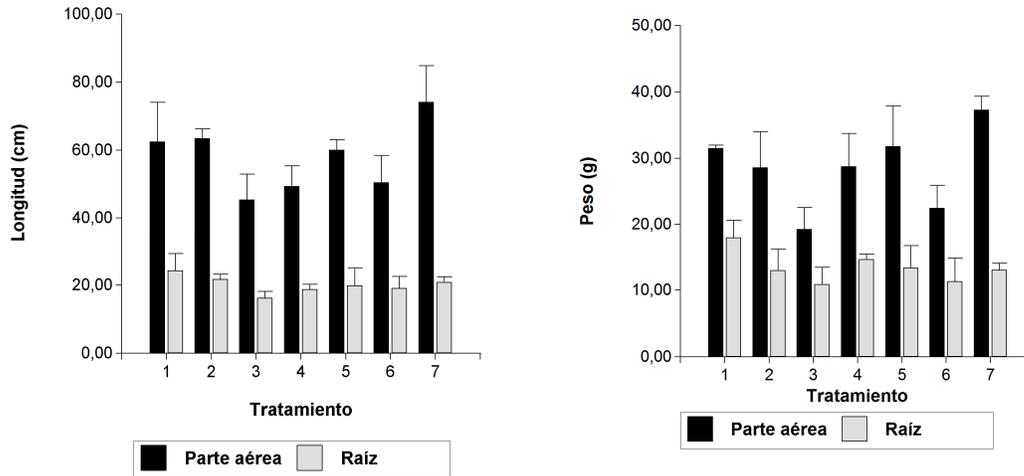


Figura 4. Efecto de diferentes tratamientos (T1 a T7, ver Tabla 1) sobre algunos parámetros de desarrollo de plantas de tomate

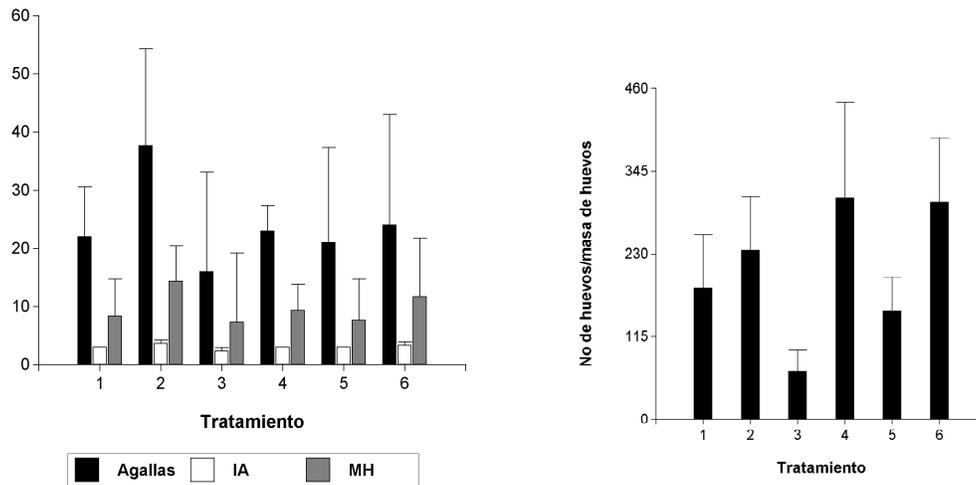


Figura 5. Efecto de diferentes tratamientos (T1 a T7, ver Tabla 1) sobre algunos parámetros poblacionales de *N. aberrans* en plantas de tomate.

Con los sustratos-mezcla el mayor rendimiento (10^{10} conidias/g de producto fermentado) fue a partir de AA/RP (75/25). Este valor no fue significativamente diferente del obtenido en AA ni en otras mezclas con AA a excepción de las mezclas AA/RL (50/50; 25/75). Sin embargo, el crecimiento del hongo fue mejor sobre AA/RP debido a que el RP disminuye la tendencia al apelmazamiento del AA. Robl et al. (2009) estudiaron la producción de conidias de *P. lilacinum* empleando residuos agroindustriales. Ellos encontraron diferencias significativas entre cepas y entre medios de cultivo. Particularmente, *P. lilacinum* Endo69 alcanzó una alta producción empleando residuos de papa. En otros estudios, *P. lilacinum* alcanzó su mayor producción (10^9 - 10^9 conidias/g) sobre granos de sorgo (Gulsar Banu et

al., 2006; Mar & Lumyong, 2012). Brand et al. (2010) usaron subproductos agrícolas de bajo costo para desarrollar un bionemática con *P. lilacinum* y obtuvieron la mayor producción sobre subproductos de soja ($4,27 \times 10^{10}$ conidias/g de peso seco). Los recuentos obtenidos en nuestro trabajo (10^{10} conidias por gramo de sustrato) son iguales o superiores a los alcanzados por otros investigadores (Robl et al., 2009; Brand et al., 2010; Mar & Lumyong, 2012; Amala et al., 2012).

Los hongos filamentosos utilizan una amplia variedad de fuentes de C y de N. En este sentido, diferentes investigaciones indican que la fuente de C, de N y la relación C/N pueden afectar significativamente el desarrollo, el número y la calidad de las conidias. Gao

et al. (2007) evaluaron el efecto de la relación C/N en medios sólidos agarizados sobre el desarrollo y la conidiogénesis en hongos biocontroladores y encontraron diferencias respecto de los requerimientos para ambos procesos. La relación C/N no afectó la producción de conidias en *P. lilacinus* M-14, pero si en *P. lilacinus* IPC-P. Las condiciones óptimas para la conidiación en ambas cepas fueron una concentración de fuente de C entre 8-12 g/l y una relación C/N entre 10:1 y 20:1. Los autores concluyeron que la relación C/N es el factor más importante para el desarrollo, la conidiogénesis y la eficiencia de las conidias. Estudios posteriores confirmaron que los requerimientos nutricionales dependen de la especie o cepa fúngica en cuestión (Gao & Liu, 2010). Sharma et al. (2014) optimizaron un medio para desarrollo y producción de conidias de *P. lilacinus* 6029 con una relación C/N = 35:1. En nuestro estudio, la producción de conidios de *P. lilacinum* en los sustratos individuales osciló entre 10^7 y 10^{10} conidias/g de producto fermentado para una relación de C/N de 2,7:1 y 16,3:1, respectivamente. En los sustratos-mezcla, el menor ($1,8 \times 10^6$) y el mayor recuento ($2,45 \times 10^{10}$) de conidias por gramo de sustrato correspondieron a una relación C/N = 10,2:1 y 19,2:1, respectivamente. No se pudo establecer asociación clara entre conidiogénesis y relación C/N; sin embargo, las mayores producciones de conidios (del orden de 10^{10}) se observaron para aquellos sustratos-mezcla con relaciones C/N entre 16,3:1 y 29,2:1.

La presencia de agallas en la raíz es un indicador de la susceptibilidad de la planta hospedadora a los nematodos manifestada a través del número y tamaño de las agallas, de las MH y del número de H/MH, por lo que dichos parámetros son utilizados para evaluar la capacidad reproductora de los nematodos agalladores. Su disminución está directamente relacionada con la presencia del hongo en la rizósfera y el parasitismo de los huevos porque reduce significativamente la multiplicación de las sucesivas generaciones del parásito. En ese sentido, Flores Camacho et al. (2007) detectaron una fuerte disminución del porcentaje de eclosión de *N. aberrans* con *Pochonia chlamydosporia* como agente de CB. Brand et al. (2004) encontraron una disminución del IA al utilizar *P. lilacinus* sobre poblaciones de *Meloidogyne incognita*. Nasr Esfahani & Ansari Pour (2006) estudiaron el efecto de *P. lilacinus* sobre *M. javanica* en plantas de tomate con inoculación simultánea y secuencial de ambos organismos y verificaron mejoría en el desarrollo vegetal con el tratamiento secuencial. La inoculación anticipada de *P. lilacinus* disminuyó el número de agallas, la producción de MH y provocó la mayor cantidad de huevos parasitados (72%). Ganaie & Khan (2010) observaron una reducción de los parámetros que evalúan la población de nematodos y una mejoría en el desarrollo de plantas inoculadas secuencialmente con *P. lilacinus* y *M. javanica*. En nuestra experiencia, la disminución de los parámetros vinculados a la densidad poblacional de *N. aberrans* en el T3 no se relacionó con un efecto beneficioso sobre el desarrollo vegetal. También se pudo observar que el número de agallas no se corresponde necesariamente con el número de MH ni con el número de H/MH. Algunas agallas no presentan MH y, por otro lado, cuando están presentes no

siempre tienen huevos en su interior. Esta situación estaría relacionada con la utilización de un inóculo (suspensión de huevos de nematodo) no estandarizado en cuanto al estadio de desarrollo y la consecuente diferencia en el desarrollo al momento de realizar las observaciones. Además, a pesar del aparente mejor comportamiento del T3 y de la presencia de *P. lilacinum* en las raíces el hongo no se detectó en los huevos del nematodo posiblemente debido a que el tiempo transcurrido entre la inoculación y la observación fue insuficiente para que el hongo parasite los huevos. En esta experiencia no se consideró el tamaño de las agallas que según algunos autores afecta la eficiencia en el parasitismo de los huevos ejerciendo un efecto protector cuando son de mayor tamaño (Flores Camacho et al., 2007; Lamovsek et al., 2013).

Entre los hongos y los nematodos pueden presentarse interacciones sinérgicas y antagonicas. Se ha demostrado que *P. lilacinum* tiene actividad antagonica hacia huevos de nematodos agalladores de la raíz. Sin embargo, no siempre se encuentran resultados satisfactorios y, a veces, el mismo hongo presenta resultados disímiles al cambiar de hospedador. Esto podría sugerir un efecto de interacción nematodo-hongo-hospedador específica. También puede incluirse el efecto que puede ejercer el tipo de sustrato utilizado en la producción de las conidias (Brand et al., 2004; Mussatto et al., 2012). Estas circunstancias, más la alta complejidad de la rizósfera son factores a considerar en el análisis de los resultados obtenidos (Ragozzino & D'errico, 2011).

Los trabajos citados difieren entre si en aspectos metodológicos como en los resultados obtenidos. Sin embargo, sus conclusiones resaltan el importante potencial de *P. lilacinum* en las estrategias de control de los nematodos agalladores de la raíz. A partir de nuestros resultados, se puede concluir que en nuestro medio hay disponibilidad de residuos agroindustriales de bajo valor económico que pueden ser utilizados como sustrato para la producción masiva de conidias de *P. lilacinum*. Tanto el AA como RP pueden formar parte de un sustrato adecuado para la germinación, desarrollo y producción masiva de conidias de *P. lilacinum*. En este sentido, es necesario efectuar más estudios para encontrar las condiciones nutricionales óptimas. Respecto de su aplicación en el control poblacional de *N. aberrans* en plantas de tomate experimentalmente inoculadas se puede notar que el hongo sobrevivió en el ambiente de la raíz pero fue incapaz de controlar la población del fitonemato. Sin embargo, teniendo en cuenta las observaciones *in vitro* de la actividad de *P. lilacinum* sobre los huevos de *N. aberrans* y los resultados de otros investigadores es importante profundizar las condiciones de experimentación en las que se evalúa la interacción nematodo-hongo-hospedador para definir el potencial de *P. lilacinum* LPSC # 876 como agente para el CB de *N. aberrans*.

Agradecimientos

Al Ing. Agr. Andrés Nico por su colaboración para el desarrollo de las actividades experimentales. A la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de La Plata por su financiación (Proyecto código 11/X650).

BIBLIOGRAFÍA

- Amala, U., T. JiJi & A. Naseema.** 2012. Mass multiplication of entomopathogenic fungus, *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson with solid substrates. *Journal of Biopesticides* 5(2): 168-170.
- Anastasiadis, I.A., I.O. Giannakou, D.A. Prophetou-Athanasidou & S.R. Gowent.** 2008. The combined effect of the application of biocontrol agent *Paecilomyces lilacinus*, with various practices for the control of root-knot nematodes. *Crop Protection* 27: 352-361.
- Argerich, C. & L. Troilo.** 2011. Manejo del cultivo para cualquier sistema de producción de tomate. En: Manual de buenas prácticas agrícolas en la cadena de tomate. Argerich C. & L. Troilo. FAO, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. pp. 55-204.
- Brand, D., C.R. Soccol, A. Sabu & S. Roussos.** 2010. Production of fungal biological control agents through solid state fermentation: a case study on *Paecilomyces lilacinus* against root-knot nematodes. *Micología Aplicada Internacional* 22(1): 31-48.
- Brand, D., S. Roussos, A. Pandey, P.C. Zilioli, J. Pohl & C.R. Soccol.** 2004. Development of a bionematicide with *Paecilomyces lilacinus* to control *Meloidogyne incognita*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 118: 81-88.
- Colavolpe, B., G. Casanova, F. Reymundo, F. Della Vecchia, E. Albertó & A. Iorio F. de.** 2012. Utilización de los desechos de la producción de hongos comestibles como co-digestor para la obtener biogas. *Avances en Energías Renovables y Medio Ambiente* 16: 1-5.
- De Araujo, A.A., L.M. Costa, E.C. Muniz, A.J. Nascimento, L.F.H. Lourenco & R. Bergamasco.** 2009. Fermentación de residuos de cangrejo y camarón para la obtención de quitinasas en medio sólido. Libro de resúmenes del Congreso Latino Americano de Ingeniería y Ciencias Aplicadas, San Rafael. Disponible en: <http://ri.ufs.br/handle/123456789/914>. Último acceso: abril 2015.
- Di Rienzo, J.A., F. Casanoves, M.G. Balzarini, L. Gonzalez, M. Tablada & C.W. Robledo.** 2008. Infostat, versión 2008. Grupo Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Flores Camacho, R., R.H. Manzanilla López, I. Cid del Prado-Vera & A. Martínez-Garza.** 2007. Control de *Nacobbus aberrans* (Thorne) Thorne y Allen con *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Gams y Zare. *Revista Mexicana de Fitopatología* 25(1): 25-34.
- FUNICA.** 2009. Producción y uso de *Paecilomyces lilacinus* para el control de nematodos fitoparásitos. Ed. Universidad Nacional Agraria, Fac. de Agronomía. Nicaragua. pp. 1-15.
- Ganaie, M.A. & T.A. Khan.** 2010. Biological potential of *Paecilomyces lilacinus* on pathogenesis of *Meloidogyne javanica* infecting tomato plant. *European Journal of Applied Sciences* 2(2): 80-84.
- Gao, L. & X. Liu.** 2010. Nutritional requirements of mycelia growth and sporulation of several biocontrol fungi in submerged and on solid culture. *Microbiology (Moscow)* 79(5): 622-629.
- Gao, L., M.H. Sun, X.Z. Liu & Y.S. Che.** 2007. Effects of carbon concentration and carbon to nitrogen ratio on the growth and sporulation of several biocontrol fungi. *Mycological Research* 111: 87-92.
- Gortari, M.C. & R. Hours.** 2014. Efecto *in vitro* de *Purpureocillium lilacinum* sobre el fitonematodo falso agallador *Nacobbus aberrans*. Resúmenes del XIII Congreso Argentino de Micología. Buenos Aires. p. 167.
- Gortari, M.C., C. Cazau & R. Hours.** 2007. Hongos nematófagos de huevos de *Toxocara canis* en un paseo público de La Plata, Argentina. *Revista Iberoamericana de Micología* 24: 24-28.
- Gulsar Banu, J., R. Iyer & M. Gunasekaran.** 2006. Mass multiplication and formulation of a nematophagous fungus, *Paecilomyces lilacinus*. *International Journal of Nematology* 16(2): 145-152.
- Hölker, U., M. Höfer & J. Lenz.** 2004. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology Biotechnology* 64: 175-186.
- Holland, R.J., T.S. Gunasekera, K.L. Williams & K.M.H. Nevelainen.** 2002. Ultra structure and properties of *Paecilomyces lilacinus* spores. *Canadian Journal of Microbiology* 48: 879-885.
- INIDEP.** 2015. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero. Langostino (*Pleoticus muelleri*). Disponible en: <http://www.inidep.edu.ar/ayuda/langostino-pleoticus-muelleri/>. Último acceso: abril 2015.
- Kiewnick, S. & R.A. Sikora.** 2006. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* strain 251. *Biological Control* 38: 179-187.
- Lamovsek, J., G. Urek & S. Trdam.** 2013. Biological control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.): Microbes against the pests. *Acta Agriculturae Slovenica* 101: 263-275.
- Lax, P., A.G. Becerra, F. Soteras, M. Cabello & M.E. Doucet.** 2010. Effect of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* on the false root-knot nematode *Nacobbus aberrans* in tomato plants. *Biology and Fertility of Soils*. DOI 10.1007/s00374-010-0514-4.
- Luangsa-ard, J., J. Houbraken, T. Van Doorn, S-B. Hong, A.M. Borman, N.L. Hyel-Jones & R.A. Samson.** 2011. *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*. *FEMS Microbiology Letters* 321: 141-149.
- Mar, T.T. & S. Lumyong.** 2012. Conidial production of entomopathogenic fungi in solid state fermentation. *KKU Research Journal* 17(5): 762-768.
- Martínez, P.F. & D. Roca.** 2011. Sustratos para el cultivo sin suelo. Materiales, propiedades y manejo. En: Sustratos, manejo del clima, automatización y control en sistemas de cultivo sin suelo. Flórez R., V.J. (Ed.). Editorial Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. pp. 37-77.
- Mussatto, S.I., L.F. Ballesteros, S. Martins & A. Teixeira.** 2012. Use of Agro-Industrial Wastes in Solid-State Fermentation Processes. En: *Industrial Waste*. Show K.Y. Ed. Intech. Shanghai, China. pp: 121-140.
- Nasr Esfahani, M. & B. Ansari Pour.** 2006. The effects of *Paecilomyces lilacinus* on the pathogenesis of *Meloidogyne javanica* and tomato plant growth parameters. *Iran Agricultural Research* 24(2): 67-75.
- Pinciroli, M.** 2010. Proteínas de arroz. Propiedades estructurales y funcionales. Tesis de Maestría en

Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Argentina. 81 pp.

Radwan, M.A., S.A.A. Farrag, M.M. Abu-Elamayem & N.S. Ahmed. 2012. Biological control of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on tomato using bioproducts of microbial origin. *Applied Soil Ecology* 56: 58-62.

Ragozzino, A & G. D'errico. 2011. Interactions between nematodes and fungi: A concise review. *Redia XCIV*: 123-125.

Robl, D., L.B. Sung, J.H. Novakivich, P.R.D. Marangoni, M.A.C. Zawadneak, P.R. Dalzolto, J. Gabardo & I.C. Pimentel. 2009. Spore production in *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson strains on agro-industrial residues. *Brazilian Journal of Microbiology* 40: 296-300.

Rodríguez Almarza, M.B. 2007. Determinación de la composición química y propiedades físicas y químicas del pulido de arroz (*Oryza sativa* L.). Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Agrarias. Escuela de Ingeniería de Alimentos. Universidad Austral de Chile. 44 pp

Rodríguez, G. 2007. Cultivo de hongos comestibles. *Fruticultura & Diversificación* 13, N° 52: 10-14.

Sharma, A., S. Sharma, A. Mittal & S.N. Naik. 2014. Statistical optimization of growth media for *Paecilomyces lilacinus* 6029 using non-edible oil cakes. *Annals of Microbiology* 64: 515-520.

Sivila, N & S. Alvarez. 2013. Producción artesanal de Trichoderma. *Tecnologías para la agricultura familiar. Tecnologías agroecológicas para la agricultura familiar.* Ed. Universitaria de Jujuy. Jujuy. 45 pp.

Sun, M.H. & X.Z. Liu. 2006. Carbon requirements of some nematophagous, entomopathogenic and mycoparasitic hyphomycetes as fungal biocontrol agents. *Mycopathologia* 161: 295-305.

Valero, A. 2009. Hacia una sustentabilidad global: la eliminación del bromuro de metilo. *Foro Internacional Científico Tecnológico EEAOC. INTA, Programa Nacional Cultivos Industriales.*

Villalba, P.L., H. Grillo Ravelo & R. Cupull S. 2009. Producción de esporas de *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin sobre polvos de arroz, sorgo y maíz. *Centro Agrícola* 36: 25-32.