

## NOTA TÉCNICA

# INCREMENTO *in vitro* DE *Aphelenchoides besseyi*<sup>1</sup>

Walter Barrantes Santamaría<sup>2</sup>, Alejandro Esquivel Hernández<sup>3</sup>,  
Carlos Manuel Araya Fernández<sup>3</sup>

### RESUMEN

**Incremento *in vitro* de *Aphelenchoides besseyi*.** Con el objetivo de establecer una metodología para incrementar *in vitro* el nematodo *Aphelenchoides besseyi*, se utilizaron tres medios de cultivo: PDA+ *Fusarium oxysporium*; 20 % de avena, 40 % de cebada y 40 % de trigo (producto comercial "Tres cereales"), y medio de arroz sin granza, en el laboratorio de nematología de la Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica, de marzo a setiembre del 2005. Los nematodos se obtuvieron de hojas de frijol con síntomas de la falsa mancha angular, se inocularon sobre los medios de cultivo, los cuales se incubaron a 26-27 °C, en la oscuridad. Se realizaron conteos semanales. Los medios de cultivo PDA + *F. oxysporium* y "Tres cereales", resultaron los más adecuados para reproducir el nematodo, debido a su fácil preparación, a la obtención de una gran cantidad de individuos en corto tiempo, y a la conservación del poder infectivo de los nematodos en plántulas sanas.

**Palabras claves:** *Fusarium oxysporium*, medio de cultivo, nematodos aéreos, fitoparásitos, hongos oportunistas.

### ABSTRACT

**Increment *in vitro* of *Aphelenchoides besseyi*.** With the objective to establishing an easy and efficient methodology to reproduce the nematode *Aphelenchoides besseyi in vitro*, for epidemiology studies, three culture-media were used: PDA+ *Fusarium oxysporium*; a mix of three cereals (20 % oat, 40 % barley, 40 % wheat) and rice media, from March to September 2005. The nematodes were obtained from bean leaves with symptoms of false angular spot. The leaves were inoculated on the three culture-media, and incubated at 26-27 °C, in the dark. Weekly counts of adults and juvenile nematodes were made. The PDA + *F. oxysporium* and "Three cereals" culture-media turned out to be apt to reproduce the nematode, due to their easy preparation, the production of a large number of individuals in a short time, and to the conservation of the infective power of the nematodes on healthy plants.

**Key words:** *Fusarium oxysporium*, culture-media, foliar nematode, phytoparasite, opportunistic fungi.

---

## INTRODUCCIÓN

La mayoría de las especies *Aphelenchoides* son de vida libre y se encuentran distribuidas

alrededor del mundo (Hunt 1993). Se han identificado cerca de 60 especies, dentro de las cuales hay depredadoras de otros nematodos; algunas se han encontrado asociadas con insectos donde

<sup>1</sup> Recibido: 2 de julio, 2007. Aceptado: 30 de noviembre, 2007.

<sup>2</sup> Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno. Universidad de Costa Rica. Alajuela, Costa Rica. walter.barrantes@gmail.com

<sup>3</sup> Laboratorio de Nematología y Laboratorio de Fitopatología, respectivamente. Escuela de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional. Heredia, Costa Rica. aesquive@una.ac.cr; caraya@una.ac.cr

pueden vivir como parásitos, otras son habitantes del suelo o en materia orgánica en descomposición. Solo un grupo reducido vive como parásitos en yemas y follaje de diversos vegetales (Christie 1974). Las principales especies fitoparásitas de importancia agronómica son *Aphelenchoides besseyi* Christie 1942, *Aphelenchoides ritzemabosi* Schwartz 1912, y *Aphelenchoides fragariae* Ritzema Bos 1891 (Hunt 1993).

*A. besseyi*, ha sido determinado en la mayoría de los campos cultivados de arroz del mundo, causando la enfermedad llamada punta blanca (McGawle *et al.* 1984, Hunt 1993), una de las más importantes enfermedades de este cultivo en muchos países. Es un nematodo ectoparásito cuyo ciclo de vida en arroz dura cerca de 10 días a 25 °C, luego con el llenado del grano, puede sobrevivir en anhidrobiosis como adulto por períodos largos (Hoshino y Togashi 2000).

En el cultivo de frijol *Aphelenchoides besseyi* y *Aphelenchoides ritzemabosi* causan la enfermedad llamada falsa mancha angular (Salas y Vargas 1984, Frank *et al.* 1996). Actualmente ha experimentado un considerable aumento en su incidencia y severidad en las principales regiones frijoleras del país (Araya y Hernández 2003; Hernández y Araya 2003).

Cerca de 20 años después que se identificó el agente causal de la enfermedad punta blanca en arroz, Todd y Atkins (1958) se iniciaron los estudios tendientes a cultivar *in vitro*, el nematodo *Aphelenchoides besseyi*. Estos investigadores determinaron que los hongos v.g. *Helminthosporium sp*, *Curvularia sp*, *Alternaria sp* y *Fusarium sp*, proporcionan un medio de cultivo adecuado para su incremento. Estos autores desarrollaron un medio de cultivo a partir de arroz sin granza, y determinaron que el nematodo se reprodujo satisfactoriamente en los frascos inoculados con los hongos citados anteriormente. Por otra parte, no se observó reproducción del nematodo en ausencia de crecimiento fungoso.

Otros cultivos que se han utilizado para reproducir eficientemente *Aphelenchoides ritzemabosi* son el tabaco, frijol y zanahoria. La tasa máxima de reproducción se obtuvo en el medio con callo de tabaco, con una progenie de 3.880

individuos provenientes de una sola hembra, en un periodo de 33 días, y a una temperatura entre 24 y 26 °C (Dolliver *et al.* 1962). Los callos de alfalfa también han servido como medio de cultivo para reproducir *A. ritzemabosi* (Gray *et al.* 1994).

En el cultivo *in vitro* de *Aphelenchoides besseyi*, en un medio constituido por papa dextrosa agar (PDA) + *Fusarium solani*. Huang *et al.* (1972), mantuvieron el hongo en el cuarto de crecimiento por siete días previo a la inoculación del nematodo. El ámbito de temperatura que logró la mayor tasa de multiplicación estuvo entre 23 y 25 °C.

Otros hongos sobre los cuales también lograron reproducir el nematodo *A. besseyi* son *Aureobasidium pullulans* (Huang y Huang 1974, Huang *et al.* 1979). Según estos autores, este hongo tiene la particularidad de no esporular en condiciones de cultivo sobre papa sucrosa agar (PSA). Se determinó que la reproducción *in vitro* del nematodo *A. besseyi* es exclusivamente anfimítica y no partenogénica como mencionan otros autores. De ahí que para tener éxito en la reproducción de *A. besseyi* se requiera inocular ambos sexos. Por su parte la especie *A. arachidis*, logra reproducirse en condiciones de laboratorio y crece sobre el micelio de los hongos *Macrophomina phaseoli* y *Botrytis cinera*, se empleó como sustrato semillas de nueces. (Bridge *et al.* 1977).

El objetivo de este estudio fue el determinar la eficiencia de métodos de cultivo *in vitro* para la reproducción de *Aphelenchoides besseyi*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en los Laboratorios de Nematología y de Fitopatología de la Universidad Nacional (UNA), Heredia Costa Rica. Los nematodos utilizados como inóculo inicial, se obtuvieron de follaje de frijol con síntomas de la falsa mancha angular, colectados de plantaciones comerciales en la localidad de El Amparo de Los Chiles, Provincia de Alajuela. El follaje de frijol se seccionó en trozos con

un tamaño de 0,5 cm y se desinfectó superficialmente por inmersión en alcohol al 75 % e hipoclorito de sodio al 0,5 %, por 1 minuto y 30 segundos respectivamente, seguido de dos lavados con agua destilada estéril. Posteriormente se colocaron cuatro trozos de tejido al azar en cada plato petri que contenían los respectivos medios de cultivo. Los tratamientos fueron los siguientes: 1- hifas de *Fusarium oxysporium* (cepa monospórica facilitada por el Laboratorio de Fitopatología de la UNA), con siete días de inoculado en papa-dextrosa-agar (PDA) (Huang *et al.* 1972), 2- arroz sin granza, esterilización dos veces por autoclave (Todd y Atkins 1958), 3- un medio constituido por 20 % de avena, 40 % de cebada y 40 % de trigo, obtenido de un producto comercial para alimento de infantes denominado “Tres cereales” (Stock 2004). Se siguió un diseño experimental completamente al azar, con 15 repeticiones (tres repeticiones fueron procesadas por semana). Cada plato petri constituyó una unidad experimental. Todos los tratamientos se mantuvieron en la incubadora a una temperatura de 26 °C, en oscuridad total, durante un periodo de cinco semanas.

Para la extracción de los nematodos del medio de cultivo se utilizó la técnica de Baermann modificado (CIAT 1982). Se realizaron extracciones y conteos semanales, se determinó el número promedio de nematodos vivos (juveniles y adultos) por tratamiento, para lo cual se extrajeron los nematodos de tres platos cada vez. En los casos donde se obtuvo gran cantidad de individuos se procedió a realizar diluciones 1/10 para favorecer su conteo. Los datos fueron transformados ( $\log(y)$ ) para favorecer su análisis, el cual consistió en un análisis de varianza, prueba de contraste y análisis de regresión.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la primera semana de cultivo el medio PDA + *F. oxysporium* alcanzó el mayor número de nematodos (Cuadro 1), al ser *A. besseyi* un saprofito facultativo, se pudo alimentar de las hifas del hongo casi inmediatamente después

de ser inoculado. Tanto en el medio con PDA + *F. oxysporium* como el de “Tres cereales”, se observaron grandes deposiciones de huevos del nematodo en la primera semana de cultivo.

El medio “Tres cereales”, desarrolló desde la primera semana crecimiento de hongos secundarios, es de suponer que estaban dentro del follaje de frijol inoculado y no fueron destruidos por el proceso de desinfección, resultados similares obtuvieron Todd y Atkins (1958), que lograron cultivar el nematodo *A. besseyi* en medio de arroz, pero solamente en los medios con presencia de hongos secundarios.

A las dos semanas de inoculados los nematodos, el medio que contenía 20% de avena, 40% de cebada y 40% de trigo, fue el más eficiente en términos de mayor cantidad de individuos por plato petri, en su mayoría juveniles, producto de la eclosión de huevos de la semana anterior. Esta tendencia se mantuvo durante las siguientes semanas, la mayor y mejor disponibilidad de alimento pudo influir para que se diera este fenómeno, con respecto a los otros tratamientos.

Los crecimientos fungosos secundarios que se desarrollaron en el tratamiento “Tres cereales”, fueron identificados dentro de los géneros *Fusarium* sp, *Curvularia* sp, *Bipolaris* sp y micelio estéril (moho blanco), en todos los casos se trató de hongos oportunistas, no patogénicos a los nematodos. El establecimiento de poblaciones de *A. besseyi* en medios de cultivo con presencia de hongos secundarios es citado por varios autores Todd y Atkins (1958); Huang y Huang (1974) y Huang *et al.* (1979). Sin embargo, el género *Bipolaris* sp. y el micelio estéril (moho blanco), no los menciona la literatura como hongos relacionados al cultivo del nematodo en condiciones *in vitro*.

A partir de la tercera semana, el medio de arroz presentó mal aspecto, olor desagradable e invasión total de hongos y bacterias, los pocos nematodos encontrados estaban inmóviles (muertos). Estos resultados se contraponen a los obtenidos por Todd y Atkins (1958), que lograron reproducir eficientemente los nematodos en este medio. Los problemas de contaminación probablemente se debieron a una mala manipula-

**Cuadro 1.** Número promedio del nematodo *Aphelenchoides besseyi*, extraídos por semana, de tres medios de cultivo *in vitro*, bajo condiciones controladas de temperatura y oscuridad. Laboratorio de Nematología, Universidad Nacional (UNA), Heredia, Costa Rica. 2005.

Tratamiento	Semana 1*	Semana 2*	Semana 3*	Semana 4*	Semana 5*
PDA+ <i>F. oxysporium</i>	225	715	5107	1289	716
“Tres cereales”	33	4584	5312	4618	177
Arroz sin granza	41	92	84	0	0

\* Cada dato corresponde al promedio tres repeticiones.

ción de los platos petri, a la hora de realizar la inoculación.

El medio con PDA + *F. oxysporium* en la semana tres, se presentaron las poblaciones más altas de juveniles y adultos, que se caracterizaron por su alta movilidad. Se observó que los nematodos se agrupaban formando ovillos o marañas entre sí. Este medio presentó la particularidad de no permitir el desarrollo de otros organismos (hongos secundarios), como si se observó en los otros medios, es posible que debido a su agresivo crecimiento, le permitiera colonizar rápidamente todos los espacios disponibles del medio, limitando físicamente el establecimiento de otros hongos.

En el análisis de varianza y análisis pos-varianza de los datos transformados, se utilizó la transformación logarítmica debido a una mayor proporción entre desviación estándar y medias de los tratamientos. Se obtuvieron diferencias significativas ( $P < 0,007$ ), con excepción del efecto tiempo ( $P > 0,2$ ). En el análisis pos-análisis hecho a través de contrastes, se encontró que

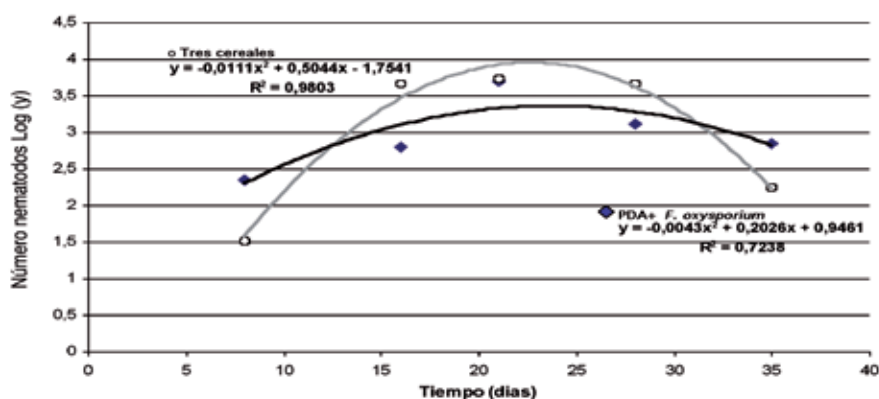
entre los tratamientos “Tres cereales” y *F. oxysporium* no existieron diferencias estadísticas significativas ( $P > 0,99$ ), y fueron superiores al arroz sin granza ( $P < 0,005$  y  $P < 0,000$ ) respectivamente (Cuadro 2).

Para determinar el modelo de mejor ajuste entre el número de nematodos extraídos en el tiempo (semana), se procedió a realizar el análisis de regresión lineal y cuadrática, para los mejores tratamientos, los resultados se presentan en la Figura 1.

La curva de regresión cuadrática del tratamiento “Tres cereales” presentó el mejor ajuste, coeficiente de determinación 0,98, respecto al coeficiente del medio PDA+ *F. oxysporium*. En ambos tratamientos, la tasa máxima de reproducción se alcanzó ( $-b/2c$ ) a los 23 días. A partir de ahí, inicia el declive de la misma, siendo más abrupta la caída en el tratamiento con PDA + *F. oxysporium* (Figura 1). Probablemente, tenga que ver con la disminución en la disponibilidad del alimento y la duración del ciclo de vida del nematodo que según Hunt (1993) el ciclo de vida

**Cuadro 2.** Análisis de contrastes de los tratamientos utilizados para incrementar *in vitro* el inóculo de *A. besseyi*. Datos transformados Log (y). Laboratorio de Nematología, Universidad Nacional (UNA), Heredia, Costa Rica. 2005.

Contraste	Estimado	Error estándar	t	P<t	-95 %	+95 %
“Tres cereales” vs Arroz	-1,86	0,48	-3,82	0,005	-2,98	-0,73
<i>F. oxysporium</i> vs arroz	-4,06	0,48	-8,34	0,000	-5,18	-2,94
“Tres cereales” vs <i>F. oxysporium</i>	-0,00	0,48	-0,00	0,998	-1,12	1,12



**Figura 1.** Curva de mejor ajuste del modelo polinómico y coeficiente de determinación, de los mejores tratamientos utilizados para incrementar *in vitro* el inóculo de *A. besseyi*. Datos transformados Log (y). Laboratorio de Nematología, Universidad Nacional (UNA), Heredia, Costa Rica. 2005.

del *A. besseyi* es de 8 a 13 días a temperatura de 30 °C. Por consiguiente, el periodo comprendido entre las dos y tres semanas de inoculación sería donde se esperaría mayor cantidad de nematodos, ésto considerando que la mayor cantidad de huevos se observaron a la semana de inoculados.

Se realizaron pruebas de capacidad de infección de los nematodos extraídos de los medios *F. oxysporium* y “Tres cereales”, con el objetivo de comprobar la capacidad de infectar de los nematodos. Como resultado, todas las plantas de frijol inoculadas con los nematodos provenientes de los tratamientos, presentaron los síntomas característicos de la FMA. Adicionalmente, las lesiones obtenidas fueron analizadas y se logró determinar la presencia del nematodo *A. besseyi* en las mismas, lo que indicó que los nematodos conservaron su poder infectivo, aún después de ser cultivados *in vitro* por varias semanas.

## CONCLUSIONES

Los medios de cultivo PDA + *Fusarium oxysporium* y alimento para bebe “Tres cereales”, resultaron ser adecuados para reproducir el nematodo *Aphelenchoides besseyi*, debido a la facilidad en su preparación, a la obtención de una gran cantidad de individuos en corto tiempo, y a

la conservación de la capacidad de infectar de los nematodos en plántulas sanas.

El medio de arroz comercial, no resultó adecuado para incrementar *in vitro* *A. besseyi*, aunque se dieron los crecimientos fungosos reportados en la literatura, la presencia de contaminación bacteriana, destruyó rápidamente los nematodos en el medio.

La curva de reproducción de los nematodos, mostró un comportamiento cuadrático con un mejor ajuste el medio “Tres cereales”  $R^2$  de 0,99. Este medio y el medio de PDA + *F. oxysporium* después de la tercera semana presentaron una reducción en el número de individuos. Posiblemente debido a un agotamiento progresivo de los nutrientes en los medios y a la acumulación de toxinas producto de los desechos de los nematodos.

El medio de PDA + *F. oxysporium* no permitió el desarrollo de otros organismos dentro del plato petri, ésto se debe a que el hongo se inoculó en el PDA una semana antes de inocular los nematodos, lo que permitió colonizar todos los espacios disponibles del medio. Esta situación tuvo la ventaja de que al final del ensayo se obtuvieron nematodos sin contaminación de otros organismos. Por otra parte, dentro de los laboratorios de patología es frecuente contar con cultivos

puros de este patógeno y las esporas de *Fusarium oxysporium* inoculadas junto con los nematodos al follaje del frijol, no constituyen un problema fitosanitario, debido a que este hongo en particular no es patogénico en etapas maduras del cultivo.

## LITERATURA CITADA

- Araya, CM; Hernández, CJ. 2003. Distribución agroecológica de enfermedades del frijol en Costa Rica. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (08):26-33.
- Bridge, J; Bos, WS; Page, LJ; Mac Donald, D. 1977. The biology and possible importance of *Aphelenchoides arachidis*, a seed-borne endoparasitic nematode of groundnuts Northern Nigeria. Nematológica 23:253-259.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Programa de frijol. 1982. Principales nematodos que atacan el frijol común y su control. Palmira, Colombia. 37 p.
- Christie, JR. 1974. Nematodos de los vegetales: su ecología y control. Limusa, México. 263 p.
- Dolliver, JS; Hildebrandt, AC; Riker, AJ. 1962. Studies of reproduction of *Aphelenchoides ritzemaosi* (Schwartz) on plant tissues in culture. Nematológica 7:294-300.
- Franc GD.; Beaupere, CM.; Gray, FA; Hall, RD. 1996. Nematode angular leaf spot of dry bean in Wyoming. Plant Disease 80:476-477.
- Gray, FA; Williams, JL; Griffin, GD; Wilson, TE. 1994. Distribution in the United State on alfalfa and cultivar reaction to mixed populations of *Ditylenchus dipsaci* and *Aphelenchoides ritzema-bosi*. Journal of Nematology 25(4S):705-719.
- Hernández, JC; Araya, CM. 2003. Cabecar, variedad de frijol grano rojo para Costa Rica. In: PITTA Frijol. Memorias "VII Reunión Anual del Sector Frijolero de Costa Rica. Instituto Nacional de Biodiversidad (INBIO), Heredia. p. 21-28.
- Hoshino, S; Togashi, K. 2000. Effect of water-soaking and air-drying on survival of *Aphenchoides besseyi* in *Oryza sativa* seeds. Journal of Nematology 32(3):303-308
- Huang, CS; Huang, SP. 1974. Dehydration and survival of rice white tip nematode, *Aphelenchoides besseyi*. Nematológica 20:9-48.
- Huang, CS; Huang, SP; Chiang, CY. 1979. Mode of reproduction and sex ratio of rice white tip nematode, *Aphelenchoides besseyi*. Nematológica 23:255-260.
- Huang, CS; Huang, SP; Lin, LH. 1972. The effect of temperature on development and generation periods of *Aphelenchoides besseyi*. Nematológica 18:432-438.
- Hunt, DJ. 1993. *Aphelenchida, Longidoridae* and *Trichodoridae*: their systematic and bionomics. Commonwealth Agricultural Bureaux. Farnham Royal. 352 p.
- McGawlwe, ME; Rush, MC; Hollis, JP. 1984. Occurrence of *Aphelenchoides besseyi* in Louisiana rice seed and its interaction with *Sclerotium oryzae* in selected cultivars. Journal of Nematology 16(1):65-68.
- Salas, LA; Vargas, E. 1984. El nematodo foliar *Aphelenchoides besseyi* Cristie (Nematode: aphelenchoididae) como causante de la falsa mancha angular del frijol en Costa Rica. Agronomía Costarricense 8:65-68.
- Stock, PS. 2004. Una alternativa en el manejo integrado de plagas agrícolas y urbanas. Folleto del curso: Biología, ecología y sistemática de nematodos parásitos de insectos. Centro de Investigaciones en Biología Celular y Molecular (CIBCM), conjunto con el Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA) de la Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. 80 p.
- Todd, EM; Atkins, G. 1958. White tip disease of rice. I. Symptoms, Laboratory culture of nematodes, and pathogenicity tests. Phytopathology 48:632-637.
- Webster, JM. 1967. The influence of plant-growth substances and their inhibitors on the host-parasite relationships of *Aphelenchoides ritsemabosi* in culture. Nematológica 13:256-262.