



Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro

Dirección de Investigación

Subdirección de Programación y Evaluación



Proyecto de Investigación 2018

Unidad:	Saltillo	División:	Agronomía	Departamento:	Parasitología
Tema estratégico (ANA/PEP):	Control biológico de nematodos fitopatógenos				
Línea de investigación:	Nematología				
Título del proyecto:	Determinación de metabolitos tóxicos de <i>Beauveria</i> spp., para el control de <i>Globodera</i> sp. in vitro.				
Presupuesto solicitado (Máximo \$75,000)	\$ 50,000	El proyecto es:	Nuevo	Continuación	x
Tipo de investigación:	Básica	x	Aplicada	Tecnológica	x
Vinculación:	Si	No	x	Fondos concurrentes:	No
Cooperante(s):	No				
Entidad (es):	Coahuila	Municipio (s):	Saltillo		
Localidades:	Buenavista, Saltillo, Coahuila				
A realizar durante el(los) año(s):	Enero-Diciembre 2018				
Participantes		Adscripción (Clave Depto.)	Expediente No.	Firma	
Responsable	Melchor Cepeda Siller	UAAAN PARASITOLOGIA	1160		
Colaborador:	Mario Alberto Cruz Hernández	UAAAN 3624	3867		
Colaborador:	Sergio Rene Sánchez Peña	UAAAN PARASITOLOGIA	2886		
Colaborador:	Miriam Desiree Dávila Medina	FCQ, UA de C	Externo		
Colaborador:					
Colaborador:					
		Grado por obtener	Matrícula	Firma	
Tesista:	Fabiola Garrido Cruz	Doctorado	61111114		
Programa Docente:	Parasitología Agrícola				
Tesista:					
Programa Docente:					
Tesista:					
Programa Docente:					
Vo. Bo.		Autoriza			
Firma y sello					
Nombre:	Dr. Ernesto Cerna Chavez. Jefe de Departamento		Dr. Armando Robledo Olivo Subdirector de Programación y Evaluación		

• Cada Jefe de Departamento deberá dejar copia para su archivo

Protocolo para Proyecto de Investigación 2018

1.-Título del proyecto

Presupuesto solicitado:

Determinación de metabolitos tóxicos de *Beauveria* spp., para el control de *Globodera* sp. *in vitro*.

\$ 50,000.00

2.- Introducción

La papa (*Solanum tuberosum* L.), en México ocupa el cuarto lugar en consumo, se cultiva en 24 estados, como alimento, se encuentra en el quinto lugar en el renglón alimenticio (Siap, 2014, CONAPAPA, 2013). Existen nematodos que se enquistan y representan un grave problema para la agricultura mundial, ya que los quistes son formas de resistencia, que dificultan su manejo y facilitan su dispersión (Whitehead y Turner, 1998). Un ejemplo de éstos es el nematodo dorado de la papa *Globodera rostochiensis*, que constituye uno de los problemas fitosanitarios más importantes en este cultivo (Rueda *et al.*, 2006). La infestación reduce los sistemas radicales, limita la absorción de agua y nutrientes, causando estrés hídrico. En campo, el cultivo presenta manchones con limitado crecimiento de las plantas, causando disminución en el tamaño de los tubérculos por lo tanto ocasionando pérdidas en el rendimiento (Tovar *et al.*, 2006).

El control biológico de *Globodera rostochiensis*, se basa principalmente, en la utilización de agentes microbianos, como bacterias y hongos antagonistas de nematodos (López -Llorca *et al.*, 2008). La acción del hongo sobre un organismo plaga, es facilitada principalmente por una gran variedad de metabolitos secundarios, producidos a lo largo del proceso de infección (Arboleda *et al.*, 2004). El empleo de metabolitos secundarios de *Beauveria* spp. es una alternativa para el control del nematodo *Globodera* sp., ya que contribuye a la reducción de contaminación ambiental y riesgo a la salud humana por el uso irracional de pesticidas.

Objetivos

Objetivo General: Identificar el metabolito tóxico del hongo *Beauveria* spp., evaluándolo sobre distintos estadios del nematodo *Globodera* sp., *in vitro*.

Objetivos Específicos:

- Evaluar la efectividad biológica de extractos del hongo *Beauveria* spp., sobre diferentes estadios de *Globodera* sp.
- Identificación molecular de especies de investigación.
- Determinación de enzimas hidrolíticas producidas por el hongo a diferentes tiempos sobre el nematodo, por medio de espectrofotometría por técnicas de microplaca.
- Identificar el metabolito(s) con mayor actividad nematocida, por medio de técnica, espectrofotometría infrarrojo y espectrometría de masas

Hipótesis

Al menos un metabolito de *Beauveria* spp., mostrará efecto nematocida sobre *Globodera* sp. *in vitro*

3.-Revisión de Literatura

La papa (*Solanum tuberosum* L.), en México ocupa el cuarto lugar en consumo, se cultiva en 24 estados, como alimento, se encuentra en el quinto lugar en el renglón alimenticio después del trigo, arroz y maíz (Siap, 2014, CONAPAPA, 2013). Como cultivo produce más proteína por hectárea después de la soya y contiene altas cantidades de carbohidratos, minerales y vitaminas (Mc Laughlin, 2005).

Los nematodos del quiste de la papa son considerados como la plaga más importante de este cultivo, en las áreas de clima frío y templado (Rivas, 2005). Se considera que estos nematodos son originarios de la zona andina de América del Sur y evolucionaron con su hospedante principal, las subespecies de *Solanum tuberosum*, de tal forma que en la actualidad el parásito es un problema endémico en todos los lugares donde está presente (González y Franco, 1997).

Se presume que el nematodo pasó a Europa con los primeros envíos de tubérculo al viejo continente, los cuales tuvieron lugar hacia la segunda mitad del siglo XVI. Posteriormente, el auge que tomó este cultivo en Europa y el hecho de que varios de sus países se convirtieron en los más importantes proveedores de semilla de papa, se cree que ha sido desde Europa el centro de diseminación más importante de este nematodo a los otros continentes (Dao y González, 1971).

En México, éste organismo fue detectado por primera vez en 1971 en un lote de producción de papa de aproximadamente una hectárea en el estado de Guanajuato. Este descubrimiento dio lugar a la cuarentena interna no.

17, el cual implicó el muestro para la detección de *G. rostochiensis* a nivel nacional en todos los estados productores de papa, prohibiendo la movilización de tubérculo semilla a lo largo y ancho del país. Hasta el 2009, de manera oficial el nematodo se encuentra distribuido en nueve estados de la república, Guanajuato, Nuevo León, Distrito Federal, Hidalgo, Tlaxcala, Puebla, Veracruz y el Estado de México (SENASICA, 2013).

Por estímulo de los exudados radiculares, emergen más del 50% de las larvas, que se encuentran en su segundo estadio dentro de los huevos que encierran los quistes y penetran en las raíces de la planta hospedante. Se alimentan y se desarrollan pasando por una serie de tres mudas; las hembras crecen y rompen el tejido radicular. Los machos maduros tienen forma de larva; abandonan la raíz y se aparean con las hembras que han quedado insertas por medio de la cabeza y cuello, en el tejido radicular. Las hembras fecundadas aumentan de tamaño y se vuelven subesféricas. Las hembras maduras tienen el cuello prominente, miden entre 0.5 y 0.8 mm de longitud con gran variación de tamaño, lo cual depende probablemente de las características del hospedero y de la nutrición durante su desarrollo. Los huevos son producidos y retenidos dentro de la hembra. La cutícula de la hembra fecundada se oscurece y endurece, transformándose en quiste, el cual puede contener hasta 500 huevos. Los quistes permanecen en el suelo después de la cosecha, y los huevos pueden mantener su viabilidad dentro del quiste en ausencia del hospedero por más de 20 años. La velocidad de multiplicación y proporción de sexos, son influenciados por la densidad de la población de nemátodos y por las características del hospedero. La disponibilidad de alimento estimula la multiplicación, la que puede alcanzar hasta 60 veces más. Cuando el alimento es limitado y la población numerosa (100 huevos por gramo de suelo), la densidad de nemátodos puede llegar a disminuir (Mai et al, 1980).

El primer signo de daño en el campo se puede observar como pequeñas áreas de forma elíptica orientadas a lo largo de los surcos, que contiene plantas con poco desarrollo. Los manchones crecen año a año, a menudo con sentido de la pendiente. Las plantas detectadas generalmente presentan un color verde más oscuro y la floración cuando se presenta se retarda considerablemente. El sistema radical aparece excesivamente ramificado y de tamaño reducido especialmente cuando se tiene altas poblaciones del nematodo (Montessoro, 1994).

En general, las pérdidas de rendimiento causadas por estos fitoparásitos dependen del grado de asociación hospedante-nematodo, de la raza y densidad poblacional del nematodo, susceptibilidad del hospedante, calidad de la semilla, fertilidad del suelo, época de siembra y condiciones ambientales (Pumisacho y Sherwood, 2002). La combinación de estos factores determinará la severidad de la enfermedad y, consecuentemente, la disminución en la producción (Ortuño y col., 1994).

En los lugares infectados con nemátodos, el control incluye rotación de cultivos, siendo lo recomendable 7 años sin el cultivo de papa para minimizar el daño; lo anterior suplementado con el uso de cultivares de papa resistentes y el uso de nematicidas químicos fumigantes o compuestos granulados sistémicos (Smith et al, 1997). El uso indiscriminado de éstos, ha ocasionado varios problemas entre ellos, la contaminación del suelo y mantos freáticos, efectos tóxicos en animales y el hombre, genotipos resistentes y muerte al mismo tiempo de los enemigos naturales de las mismas plagas y de otros organismos que ante la ausencia de sus reguladores se convierten en plagas secundarias (Franco, 2006).

El control biológico es una práctica agrícola en constante crecimiento que busca la destrucción total o parcial de patógenos e insectos plaga, frecuentemente mediante el uso de enemigos naturales (Spardo y Gullino, 2004). Se conocen aproximadamente 100 géneros y 700 especies de hongos entomopatógenos, *Beauveria bassiana* es el hongo de mayor uso en el manejo de plagas, fue descubierto en 1834 por Agostino Bassi, y en 1980 se registró comercialmente en Estados Unidos (EUA). Pertenece a la división Ascomycota, del orden Hypocreales, con conidióforos agrupados en forma de racimos y conidias de color blanco cremoso.

La acción del hongo sobre un organismo plaga, es facilitada principalmente por una gran variedad de metabolitos secundarios, producidos a lo largo del proceso de infección (Arboleda et al., 2004). Aunque se ha reportado un elevado número de metabolitos producidos por los hongos entomopatógenos, solo una pequeña fracción han sido examinados y caracterizados. Los mismos son generalmente más pequeños que el tamaño promedio de las macromoléculas biológicas. Algunos pueden ser de estructura orgánica simple, pero con frecuencia son compuestos de estructura un poco más compleja, muchos de ellos son toxinas peptídicas cíclicas y lineales, las que se derivan de otros metabolitos primarios, en algunos casos con estructuras inusuales y acompañadas ocasionalmente de procesos de biosíntesis específicos (Pucheta et al., 2006) El aislamiento y estudio de estas toxinas, es de gran importancia debido a la posibilidad de su utilización.

4.- Procedimiento Experimental CONTINUACION

Se identificará a nivel molecular, la especie de hongos con las que estamos trabajando.
 Se determinará por medio de la técnica de microplaca, una cinética de las enzimas hidrolíticas (quitinasa, lipasa y proteasa) producidas por el hongo sobre el nematodo *Globodera rostochiensis*.
 Se identificará por medio de espectrometría de masas los metabolitos con actividad nematocida de *Beauveria* spp., sobre el nematodo *Globodera* sp.

Cronograma de Actividades para el 2018.

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Identificación molecular a nivel de género y especie del nematodo <i>Globodera</i> sp. y hongo <i>Beauveria</i> spp. utilizados para este trabajo	x											
Cinética de las enzimas hidrolíticas (quitinasa, lipasa y proteasa) producidas por el hongo sobre el nematodo	x											
Espectrometría de masas los metabolitos con actividad nematocida de <i>Beauveria</i> spp., sobre el nematodo <i>Globodera</i> sp.		x										
Dos publicaciones científicas			x	x								
Presentación en congresos, nacional e internacional						x					x	
Obtención del grado de Doctorado en Ciencias en Parasitología Agrícola, la Alumna Fabiola Garrido						X						

Cronograma de distribución de presupuesto para el 2018.

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Identificación molecular a nivel de género y especie del nematodo <i>Globodera</i> sp. y hongo <i>Beauveria</i> spp. utilizados para este trabajo	X											
Cinética de las enzimas hidrolíticas (quitinasa, lipasa y proteasa) producidas por el hongo sobre el nematodo	X											
Espectrometría de masas los metabolitos con actividad nematocida de <i>Beauveria</i> spp., sobre el nematodo <i>Globodera</i> sp.		X										
Dos publicaciones científicas			x	X								
Presentación en congresos, nacional e internacional						x					x	

Duración total del proyecto

Año de Inicio	2018	Año estimado de conclusión	2018
---------------	------	----------------------------	------

5.-Productos Esperados

- Dos publicaciones científicas
- Dos presentaciones en congresos
- Tesis de doctorado en Parasitología Agrícola

6.-Literatura Citada

Arboleda, V., Delgado, B. Valencia, J. 2004. Detección de beauvericina en el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* mediante el uso de anticuerpos policlonales. Revista Colombiana de Entomología 30 (2): 125-130

Dao, F. y González, J. 1971. El nematodo dorado de la papa, *Heterodera rostochiensis* (Woll.) y su presencia en los Andes Venezolanos. Agronomía Tropical 21: 105-110.

Franco, A., et al. Efecto tóxico de semillas de cuatro variedades de carica papaya (*caricaceae*) en *spodoptera frugiperda*

- González, A y Franco, J. 1997. Los nemátodos en la producción de semilla de papa. En: Hidalgo, O. 1997. Manual de producción de semilla de papa. Lima, Centro Internacional de la Papa. Fascículo 3.9. 13p.
- Greco, N. y Crozzoli, R. 1995. Nematodos del quiste de la papa, *Globodera rostochiensis* y *G. pallida*: aspectos generales. Fitopatol. Venez. 8: 26-33.
- Lopez-Llorca L.V., Maciá-Vicente J.G., Jansson H.B. 2008. Mode of action and Interactions of nematophagous fungi, en: Ciancio A., Mukerji K.G. (Eds.), Integrated Management and Biocontrol of Vegetable and Grain Crops Nematodes. Springer, The Netherlands, pp. 51-76.
- Mai, W., Brodie, B., Harrison, M., Jatala, P. 1980. Nematodo de la pudrición de la papa. Compendio de enfermedades de la papa. pp. 131-134.
- McLaughlin, B. 2005. Potatoes: Changing Production, Changing Consumption. VISTA of the Agri-Food Industry and the Farm Community, Catalogue no. 21-004-XIE. Ottawa, Ontario, Canada. 8 p.
- Montessoro, R. 1994. Enfermedades y desórdenes de la papa en México. México, Sabritas. 86p.
- Ortuño, N.; Franco, J.; Oros, R. y Main, G. 1994. Producción de tubérculos para semilla libre de nematodos. Rev Manejo Integrado de Plagas 52.
- Pucheta, M., Flores, A., Rodríguez, S., De La Torre, M. 2006. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. Interciencia 31 (12): p. 856-860.
- Pumisacho, M y Sherwood, S. (Eds) 2002. El cultivo de la papa en el Ecuador. Quito, INIAP y CIP. 229p.
- Rivas, E. 2005. Determinación de la preferencia de nematodos de quiste asociados al cultivo de papa *Solanum tuberosum* en los municipios de Patzún y Zaragoza, Chimaltenango. Tesis Ingeniero Agrónomo. Facultad de Agronomía Universidad de San Carlos de Guatemala. 93p.
- Rueda, E., Tarazón, M., García, J., Murillo, B., Holguín, R., Flores, A., Preciado, P., Barrón, J., García, J. 2006. Presencia del Nematodo Dorado *Globodera rostochiensis* (Wollenweber) Skarbilovich, en Lotes de Papa (*Solanum tuberosum* L.) del Estado de Coahuila, México. Rev. Mex. Fitop. 24: 20-26.
- SIAP (Sistema Integral de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2001. Análisis de la Producción y Consumo de Papa en México. Servicio de Información. Secretaría de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural Pesca y Alimentación (SAGARPA). México, D.F. 37 p.
- Smith, I., McNamara, D., Scott, P., Holderness, M. 1997. *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida* Data Sheets on Quarantine Pests. pp. 601-606. En: Quarantine Pest for Europe. second ed. CAB International & EPPO. UK 1425 p
- Spardo, D., Gullino L., 2004. State of the art future prospects of biological control of postharvest fruit diseases. International Journal of Food Microbiology 91: 185-194.
- Tovar, S., Cid del Prado V., Sandoval I., Martínez G., Nicol J., Evans K. 2006. Los nematodos formadores de quistes en México. Revista Mexicana de Fitopatología, 24: 145-151
- Whitehead, A., Turner, S. 1998. Management and regulatory control strategies for potato cyst nematodes (*Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida*). Potato cyst nematodes: biology, distribution and control. Wallingford: CABI Publishing , 135-152.