



EFFECTO NEMÁTICIDA DE LOS HONGOS *Verticillium dahliae* y *Fusarium proliferatum* SOBRE HUEVOS DE *Ascaridia galli* (Nematoda: *Ascaridida*)

¹Evelyn Henríquez^{1, 2}, ^{1,2}Nivia Ríos, ²Ricardo Sousa & ^{1,2}Nidia Sandoval

¹Laboratorio de Investigaciones en Parasitología Ambiental, Facultad de Ciencias Naturales y Tecnología Universidad de Panamá

²Departamento de Microbiología y Parasitología

E-mail: evelyn_419@hotmail.com, ndsandoval@hotmail.com

RESUMEN

El uso de desparasitantes químicos en gallinas crea en algunos parásitos resistencia a los mismos, razón por la cual surge la idea de la utilización de microorganismos antagonistas que actúan como enemigos naturales con la capacidad de atacar, matar y digerir nematodos; tal como ocurre con los hongos nematófagos. Este trabajo se llevó a cabo para conocer el efecto de los hongos *Verticillium dahliae* y *Fusarium proliferatum* sobre los huevos de *Ascaridia galli*. El trabajo de campo consistió en recolectar intestinos de gallinas de traspatio para revisar las heces y los intestinos de estas aves. A los vermes adultos de *A. galli*, se les extrajo los huevos y se les determinó las diferentes etapas de embriogénesis durante un periodo de 120 h a 28 °C. Posteriormente se evaluaron los efectos de los hongos *V. dahliae* y *F. proliferatum* en el desarrollo de los huevos durante 7 días. El bioensayo con *V. dahliae* permitió encontrar que la fase de contacto del hongo con el huevo se dio a las 24 h, la fase de adherencia a las 36 h, la fase de penetración a las 48 h y la fase de consumación a las 72 h. Con el hongo *F. proliferatum* los mismos resultados se lograron aproximadamente 15 h después. Los resultados comprueban el efecto ovicida de los hongos estudiados, demostrando así, su uso potencial como biocontrolador de los huevos parásitos en el ambiente.

PALABRAS CLAVES

Ascaridia galli, hongos nematófagos, control biológico, *Fusarium proliferatum*, *Verticillium dahliae*.

ABSTRACT

Since the use of chemical antiparasitics in hen creates resistance in some parasites to them, we explored the idea of using antagonistic microorganisms which may act as natural enemies with the capacity to attack, kill and phagocytose nematodes; similar to what happens with nematophagous fungi. This study aimed to shed light on the effect of fungi *Verticillium dahliae* and *Fusarium proliferatum* on the eggs of *Ascaridia galli*. The field work consisted on collecting intestines of backyard hens to check the feces and intestines. From the adult vermes of *A. galli*, eggs were removed and the different phases of embryogenesis were determined during 120 hours at 28 °C. Thereafter, the effects of fungi *V. dahliae* and *F. proliferatum* were assessed in the development of eggs during 7 days. The bioassay with *V. dahliae* allowed to determine the contact phase of fungi with the egg that occurred at 24 h, the phase of adherence at 36 h, the phase of penetration at 48 h and the phase of consummation at 72 h. With the fungus *F. proliferatum* the same results were obtained approximately 15 h later. The results prove the ovicidal effect of the fungi studied, showing its potential in biological control of parasite eggs in the environment.

KEYWORDS

Ascaridia galli, nematophagous fungi, biological control, *Fusarium proliferatum*, *Verticillium dahliae*

INTRODUCCIÓN

Ascaridia galli, parásito responsable de la ascaridiasis aviar, es un nematodo que se localiza en el tracto intestinal de diversas especies de aves y se considera uno de los vermes más extendidos, tanto en las poblaciones silvestres como domésticas de todo el mundo. Actualmente se considera a *A. galli* un importante problema económico en las explotaciones avícolas a nivel mundial (Ramírez *et al.*, 2005).

En los sistemas de producción animal han intervenido en la relación parásito – hospedero y han roto el equilibrio ecológico entre ambos con el uso frecuente de los desparasitantes y es debido a estas resistencias a los controles químicos que en los últimos años se ha estado investigando la posibilidad de utilizar las diversas asociaciones biológicas con la finalidad de llegar a establecer su uso potencial para el control de los parasitismos gastrointestinales con la utilización de microorganismos antagonísticos como los hongos nematófagos los cuales son microorganismos con la capacidad de atacar, matar y digerir nematodos (adultos, juveniles y huevos) (González, 2013).

El uso frecuente de desparasitantes químicos ha creado resistencia a los mismos en los animales domésticos. Por ese motivo es que en los últimos años se ha investigado la posibilidad de utilizar las diversas asociaciones biológicas para el control de los parasitismos gastrointestinales. Se ha prestado atención a investigar los microorganismos antagónicos, como los hongos nematófagos, los cuales son microorganismos con la capacidad de atacar, matar y digerir nematodos (adultos, juveniles y huevos) (González, 2013).

Estos hongos tienen la habilidad de usar los nematodos como una fuente nutritiva adicional, facilitando un recurso alternativo o suplementario, de tal manera que al pasar a estado parasítico cambian su morfología y desarrollan las trampas de captura (Nordbring-Hertz, 2002; Barron, 2003). Dependiendo de las estructuras se dividen en cuatro grupos: hongos predadores o atrapadores de nematodos, hongos endoparásitos o endozóicos, hongos productores de toxinas, hongos parásitos de huevos.

Este trabajo se evaluó el efecto de los hongos *Verticillium dahliae* y *Fusarium proliferatum* sobre los huevos de *Ascaridia galli* determinando su patogenicidad en diferentes disoluciones de esporas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se revisaron las heces extraídas de 47 intestinos de gallinas de traspatio procedentes de cuatro criaderos, ubicados en las provincias de Panamá, Coclé y Colón en la búsqueda del nematodo *A. galli*, y se anotó en una base de datos el espectro parasitológico completo de cada intestino. Lograda la identificación microscópica de los huevos, se abrió el intestino para coleccionar todos los nematodos macroscópicos presentes. En los intestinos de 15 gallinas de patio se detectó la presencia del adulto de *A. galli*, se trituró el intestino del nematodo y se separaron los huevos de los parásitos. Estos huevos fueron almacenados en solución salina a 4 °C hasta el momento de realizar el recuento de los mismos. A esta temperatura, los huevos detienen su proceso de embriogénesis. Los huevos colectados de varios ejemplares de *A. galli* fueron contabilizados utilizando una cámara MacMaster, en la cual se colocó en dos celdas la solución madre de huevos (0.5 ml por celda) y se calculó la cantidad de huevos por ml de la solución.

A las dos especies de hongos que se evaluaron en esta investigación *Fusarium proliferatum* y *Verticillium dahliae* se les verificó el género y la especie con la clave taxonómica de Bernett y Hunter, 1998. Ambos hongos fueron donados por el Proyecto ICBG Panamá como aporte en el Desarrollo de la investigación realizada con hongos nematofagos. Los hongos fueron cultivados en medio Agar Sabouraud (Merck KGaA 1.05438.0500) y Agar Agua (Difcolaboratory 0140-01) lográndose generar el crecimiento de las colonias con sus esporas. Se prepararon suspensiones de conidias de ambos hongos en agua destilada con Tween 80 al 0.1%.

Se determinó la concentración de conidias mediante conteo en cámara Neubauer utilizando una dilución de 1/10 de las suspensiones originales.

En el bioensayo se inoculó una solución con 100 huevos de *A. galli* por pocillos en microplatos de 6 pocillos y se le añadió disoluciones de esporas de los hongos *V. dahliae* y *F. proliferatum* inoculando desde $5,25x^8$, $5,25x^7$, $5,25x^6$, $5,25x^5$. Se monitoreó en el microscopio la invasión de hifas del hongo sobre los huevos cada día, hasta completar 4 días. Pasado este periodo se realizaron montajes de la solución para la observación microscópica de la penetración hifal a la pared del huevo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Desarrollo embrionario de los huevos de *Ascaridia galli* en agua destilada a 28°C

A las 0 h el huevo de *A. galli* no estaba segmentado (0% de evolución) (Fig. 1.a). A las 24 h presentó la primera segmentación con un 20% de evolución (Fig. 1.b). A las 36 h se observó el estadio de 4 células, lo cual representa un 25 % de evolución (Fig. 1.c). A las 48 h con un 40% de evolución se observaron los blastómeros (Fig. 1.d). Tan pronto como el número de blastómeros ya es incontable, se está en la fase de mórula (45% de evolución) y se alcanzó a las 60 h (Fig. 1.e). Por la organización interna de las células y el alargamiento de la masa celular da paso a la llamada forma arriñonada a las 72 h, con un 50% de evolución embrional, que a su vez a las 96 h, en el curso de nuevas

divisiones se convierte en la forma de renacuajo o de maza, con un 60% de desarrollo (Fig. 1.f). A las 108 h el embrión tomó paulatinamente una forma cilíndrica, con un avance del 80% de evolución (Fig. 1.g), se enrolla en el limitado espacio interno. A las 116 h, sus movimientos se hacen más activos, alcanzando el 90% de evolución (Fig. 1.h) y a las 120 h, adoptan diversas posiciones con múltiples enrollamientos y presiona con movimientos de sacudida sobre la cáscara para poder eclosionar a la forma de larva, logrando el 100% de desarrollo embrionario (Fig. 1.i).

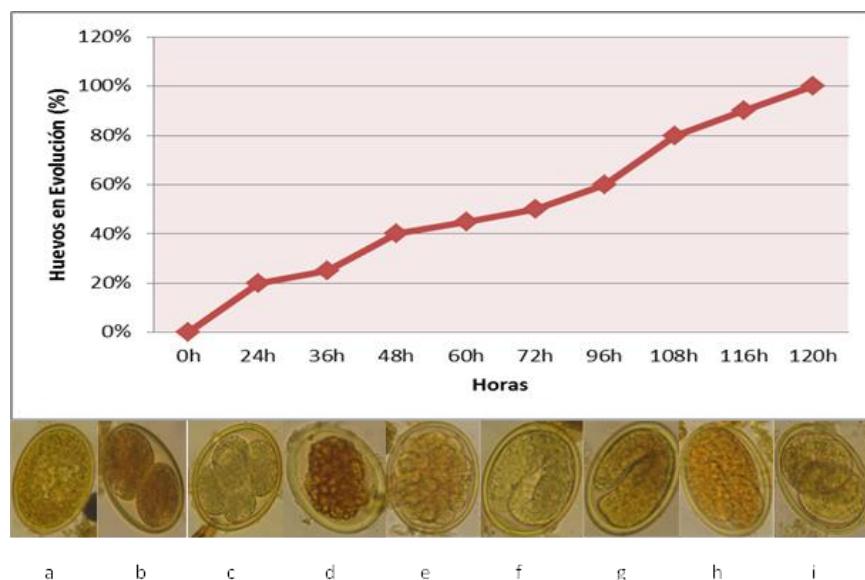


Fig. 1. Desarrollo embrionario de los huevos de *Ascaridia galli* observado durante 5 días en agua destilada a 28°C.

2. Bioensayo con los hongos

El cultivo de los hongos *V. dahliae* y *F. proliferatum*, se llevó a cabo en los medios Agar Sabouraud y Agar Agua. Los cultivos se incubaron a temperatura ambiente durante 7 días para conseguir suficiente biomasa. El medio Agar Sabouraud dio las condiciones ideales de producción de inóculo, con él se obtuvo un mayor diámetro de la colonia en ambos hongos en comparación con el medio Agar Agua. Estas diferencias pueden ser debidas a que cada especie utiliza como fuente de nutrientes compuestos que son suministrados de manera diferente por los diversos sustratos (Concepción, 1999).

De acuerdo con lo reportado en la literatura, la temperatura óptima de crecimiento y función depredadora de un hongo se encuentra entre los 15° C y los 30°C, alcanzando su máxima actividad en la formación de hifas entre los 25° C y 28°C (Cooke, 1963). Esta fue la razón de utilizar este rango de temperatura para la incubación de los cultivos. Por otra parte, algunos autores aseguran que otros factores como humedad, luz, oxígeno, pH, pueden también influir en el desarrollo de estas estructuras (Sagiés *et al.*, 2011).

La clasificación de los hongos nematófagos utilizados fue según su modo de acción, tanto en *V. dahliae* como en *F. proliferatum*, y acorde con lo descrito por Lysek & Nigenda (1989). Estos hongos son parásitos de huevos y su grado de ovidad es de 3er tipo. Esto concuerda con estudios realizados donde utilizan especies de *Fusarium* spp. como parásitos de huevos y quistes de *H. schachtii* y *H. glycines* (Nigh *et al.*, 1980, Morgan-Jones *et al.*, 1981; West *et al.*, 1988; Gintis *et al.*, 1983; Morgan-Jones, 1984).

Las observaciones realizadas en esta experiencia, mostraron la presencia de hifas adhesivas en el ensayo de ambos hongos sobre los huevos *A. galli*. A medida que aumentó el tiempo de contacto de los huevos de *A. galli* con la cepa fúngica, se formó una red hifal que atrapó a los huevos de *A. galli* y a la vez mostraban una ruptura de los huevos. El hongo aumenta la capacidad nematófaga, porque estas estructuras amplían las áreas de contacto con los nematodos. Lo que no sucede con otros tipos de hongos que forman anillos o dedos, en los cuales el punto de contacto para la captura es más reducido, disminuyendo entonces la posibilidad de atrapar a los nematodos (Barron, 1977).

Cuando la cutícula de la cáscara del huevo es penetrada por medio de las hifas, se produce un crecimiento o hinchazón que se distribuye totalmente en el contenido del huevo. Esto es considerado como una acción mecánica y a esta le sigue una alteración enzimática que afecta la permeabilidad del huevo de *A. galli*, incluso puede causar desordenes fisiológicos ante la penetración de la hifa, para utilizar los compuestos orgánicos de los huevos así degradados como sustancias nutritivas (Núñez, 2002).

También, en otros estudios, encontraron a esta especie, *V. dahliae*, atacando huevos de varias especies de nematodos sobre placas de agar in vitro y creciendo saprofiticamente sobre huevos muertos (Nigh, 1979). En ese mismo sentido, el hongo *V. dahliae* fue reportado como parásito de huevo de *Globodera pallida* por Tikhonov *et al.* (2002).

La actividad ovicida (tipo 3) de *F. proliferatum* sobre huevos de *Ascaris lumbricoides* también fue determinada en trabajos anteriores (Lsek *et al.*, 1982), lo que confirma los resultados obtenidos en este trabajo.

El monitoreo de la invasión de hifas de ambos hongos sobre los huevos de *A. galli* se llevó a cabo durante 4 días. En el caso del hongo *V. dahliae*, la germinación de esporas y el desarrollo del tubo germinativo se observó después de 12 h de haber sido inoculadas. Algunos tubos germinativos ya estaban orientados hacia la pared del huevo, intentando penetrar la cutícula de los huevos y mostraban un inicio en la ramificación de las hifas sobre la pared de los huevos.

En el bioensayo con el hongo *F. proliferatum* se dieron las mismas fases con el huevo de *A. galli*. Sin embargo, lo que varió fue el tiempo, ya que el desarrollo de la infección fue más lento en comparación con *V. dahliae*, esto puede ser debido, a que la acción ovicida en *F. proliferatum* es mucho menor sobre los huevos de *A. galli*, que sobre los huevos de *V. dahliae* (Fig. 2).

El inicio de la actividad predadora y cuánto tiempo puede durar, puede deberse a las exigencias o capacidades nutricionales de los hongos en el momento de contacto con el huevo del nematodo, aspecto enigmático que requiere de próximas investigaciones para comprender su biología (Núñez, 2002).

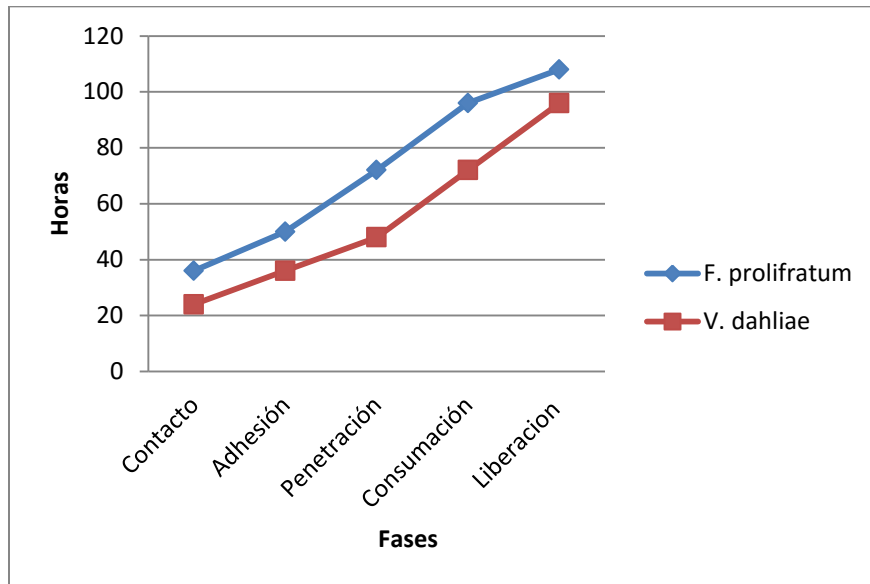


Fig. 2. Fases de los hongos *Verticillium dahliae* y *Fusarium proliferatum* durante 120 h de ensayo. Se observaron las diferentes fases de los hongos *V. dahliae* y *F. proliferatum* y el tiempo de invasión sobre los huevos de *A. galli*.

La abundante producción de clamidosporas y la forma temprana en que las mismas se desarrollan, ponen en evidencia que *V. dahliae* podría ser un buen candidato para ser empleado en el futuro como un agente de control biológico de los nematodos gastrointestinales de gallinas, ya que de acuerdo con los reportes de la literatura mundial, esta es una de las principales características que debe tener un buen organismo para el control biológico (González, 2013). Sin embargo, su utilización no es apta en áreas con cultivos tales como el olivo, sandía, papas y la berenjena. Esto debido a que invade todo el sistema vascular y la enfermedad que provoca este hongo, tiene el potencial para eliminar producciones comerciales de los cultivos en muchas localidades (Soares *et al.*, 2009).

Por otro lado, las toxinas de *Fusarium* spp. pueden causar además aberraciones en la salud de los animales; pueden llegar a causarles la muerte (Weber *et al.*, 2006).

Con respecto a la salud humana, las especies de *Fusarium* puede causar micosis oportunistas en pacientes con enfermedades hematológicas (Girmenia *et al.*, 2000).

Debido a las características arriba mencionadas, el uso de *F. proliferatum*, *V. dahliae*. Como agente de control biológico (en granjas a nivel doméstico) sobre huevos de *A. galli* todavía no está definido. Se debe tener en claro cuál será la utilidad del suelo que se someterá al método de biocontrol con estos dos hongos. Es recomendable realizar otros estudios que sustenten el impacto ambiental, al utilizar estos hongos para el control de la infección aviar con *A. galli*, a fin de garantizar la salud humana/animal y otras condiciones ambientales relacionadas.

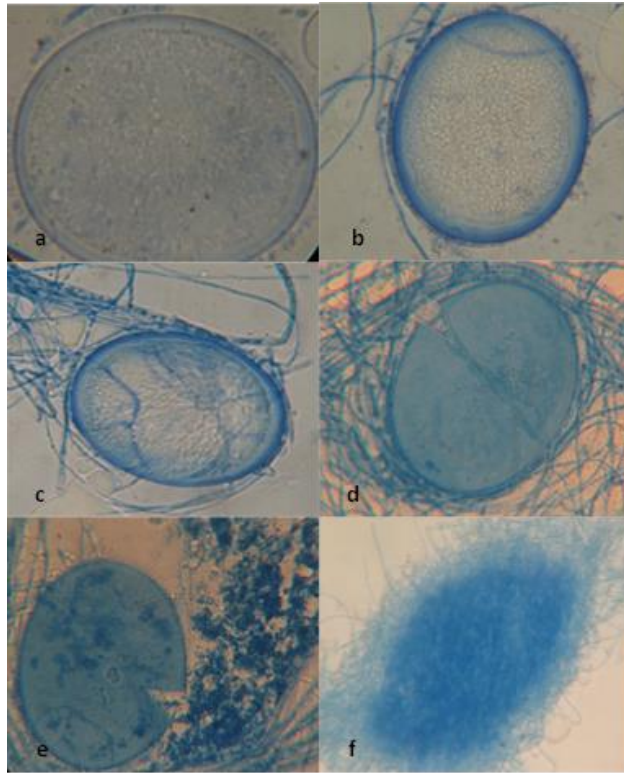


Fig. 3. (a) Huevo de *A. galli* sin el hongo, (b) Fase de contacto hongo-huevo, (c) Fase de adherencia hongo- huevo, (d) fase de penetración, (e) Fase de consumación, (f) fase de liberación.

CONCLUSIÓN

El tiempo de embriogénesis de los huevos de *A. galli* demoró 120 h para completarse. *V. dahliae* realizó todas las fases de desarrollo sobre los huevos de *A. galli* en 96 h, mientras que *F. proliferatum* requirió aproximadamente 15 h más para completar su ciclo de liberación. Se demostró la capacidad nematófaga desplegada por los hongos *F. proliferatum* y *V. dahliae*, en condiciones *in vitro*, frente a los huevos de *A. galli*. A pesar de saber que *F. proliferatum* es tóxico para algunos cultivos y *V. dahliae* también para algunos animales, se generó conocimiento útil que permitirá sentar las bases para el desarrollo y aplicación de estrategias no químicas de control de los nematodos gastrointestinales de las gallinas, para la construcción, en el futuro de sistemas de producción avícola sustentables.

AGRADECIMIENTO

Al Laboratorio de Investigaciones en Parasitología Ambiental (LIPAAM) por el apoyo en infraestructura y asesoramiento brindado para esta investigación. A los señores Julio y José Frías, a mis compañeros Rigoberto Fernández, Mariel Guillen, Karla Ramos, Katherine Rodríguez y Arleny García por ayudarme en la recolección de algunas muestras. Agencia Española de Cooperación Internacional por el financiamiento parcial de este proyecto de investigación y a la Dra. María Del Mar Siles-Lucas del Instituto de Recursos naturales de Salamanca, España, por el asesoramiento técnico que siempre ha prestado en el LIPAAM.

REFERENCIAS

Barron, G.L. 1977. The nematode destroying fungi. Topics in Mycobiology, No.1, Canadian Biological Publications, Ltd., Guelph, Canada, 140 pp.

Barron, G.L. 2003. Predatory fungi, wood decay, and the carbon cycle. Biodiversity 4: 3-9.

Concepción, M. 1999. Caracterización biológica y molecular de hongos patógenos de huevos de nematodos. Tesis de doctorado. Universidad de Alicante, España.

Cooke, R.C. 1963. Ecological characteristics of nematode-trapping hyphomycetes. I. Preliminary studies. *Ann. Appl. Biol.* 52: 431-437.

Gintis, B.O., R.C Morgan-Jones & R. Rodríguez-Kabana. 1983. Fungi Associated with Several Developmental Stages of *Heterodera Glycines* from an Alabama Soybean Field Soil. *Nematropica* 13: 181-200.

Girmenia, C, L. Pagano, L. Corvatta, L. Mele, A. Del Favero & P. Martino. 2000. The epidemiology of fusariosis in patients with haematological diseases. *British J. Hematol.* 111: 272-276.

González, E. 2013. Evaluación in vitro de hongos nematofagos sobre larvas L3 de nematodos gastrointestinales de bovinos. Maestría en ciencias biológicas. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá D.C., Colombia.

Lsek, H, O. Fassatiova, N. Cuervo-Pineda & N. Lorenzo Hernández. 1982 "Ovicidal fungi in soils of Cuba". *Folia parasit. (Praha)*. 29: p. 265-270.

Lysek, H., & G. Nigenda. 1989. "Capacidad de autodeshormintización del suelo". *Salud Pública Mex.* 31: 763-771.

Morgan-Jones, G.O.B., Gintis & R. Rodríguez-Kabana. 1981. Fungi Associated with Cyst of Potato Cyst Nematodes in Peru. *Nematropica* 16: 21-31.

Morgan-Jones, R, Rodríguez-Kabana & J.G. Tovar. 1894. Fungi associated with Cyst of *Heterodera Glycines* in the Cauca Valley, Colombia. *Nematropica* 14: 173-177.

Nigh, E.A., I.J., Thomason, & S.D. Van Gundy. 1980. Identification and Distribution of Fungal Parasites of *Heterodera schachtii* eggs in California, USA. *Phytopathology* 70: 884-889.

Nigh, E.L. 1979. *Acremonium strictum* and *Fusarium oxysporum*, Two Fungal Egg Parasites of *Heterodera schachtii*, the sugarbeet cyst nematode. PhD. Tesis. California University, USA.

Nordbring-Hertz, B., & H. Jansson Tunlid. 2002. A. Nematophagous fungi. En: Encyclopedia of life sciences, Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing. Group. [http://: www.els.net](http://www.els.net). Visitado el 21 de enero de 2015.

Núñez, A. 2002. Aislamiento y evaluación de hongos nematófagos asociados a quistes de *Globodera rostochiensis* (Woll.) en la región del Cofre de Perote. Tesis de maestría. Universidad de Colima, México.

Ramírez, J., T. Arangüena, J. Ramón & S. Fernando. 2005. *Ascaridia galli*: nuevas tecnologías para el control de una antigua parasitosis. Selecciones Avícolas. Ibérica de Tecnología Avícola (Ibertec), Laboratorio de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca.

Sagüés, M.F., P. Purslow, S. Fernández, L. Fusé, L. Iglesias & C. Saumell. 2011. Hongos nematófagos utilizados para el control biológico de nematodos gastrointestinales en el ganado y sus formas de administración. Rev. Iberoam. Micol.; 28(4): 143-147.

Soares, P., M. Nozaki, B. Barbosa, J. Santos & J. Barbosa. 2009. Growth and sporulation of two species of *Arthrobotrys corda* in different culture media and two environments. Biosci. 25 (2): 63-74.

Tikhonov, V., L López-Llorca, J., Salinas & J. Hans-Borje. 2002. Purification and characterization of chitinases from the nematophagous fungi *Verticillium chlamydosporium* and *V. suchlasporium*. Fungal Genet. Biol. 35: 67-78.

Weber, Z., M. Kosteki, S. Von Bargen, M. Gossman, A. Waskiewicz, J. Bocianowski, M. Knaflewski, C. Büttner & P. Golinski. 2006. *Fusarium* species colonizing spears and forming mycotoxins in field samples of asparagus from Germany and Poland. J. Phytopathology 154: 209-216.

West, C.P., E. Oosterhuis & R. Robbins. 1988. The effect of *Acremonium coenophialum* on the growth and nematode infestation of tall fescue. Plant. Soil. 112: p. 3-6.

Recibido enero de 2016, aceptado mayo de 2016.