

In vitro* Toxicity of Tropical Mexican Micromycetes on Infective Juveniles of *Meloidogyne incognita

Toxicidad *in vitro* de Micromicetos del Trópico Mexicano en Juveniles Infecciosos de *Meloidogyne incognita*

Marcela Gamboa Angulo, Jorge A. Moreno Escobar, Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43 No. 130, Col. Chuburná de Hidalgo, Mérida CP 97200, Yucatán, México; **Elizabeth Herrera Parra**, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, INIFAP. Km 25 Carretera antigua a Mérida-Motul, Mocochoá CP 97450, Yucatán, México; **Jaime Pérez Cruz, Jairo Cristóbal Alejo**, Instituto Tecnológico de Conkal, Km. 16.3 Antigua carretera Mérida-Motul, Conkal CP 97345 Yucatán, México; **Gabriela Heredia Abarca**, Red de Biodiversidad y Sistemática, Instituto de Ecología A.C., Km 2.5 Carretera antigua a Xalapa-Coatepec No. 351. Col. El Haya, Xalapa CP 91070, Veracruz, México. Corresponding author: jairoca54@hotmail.com

Received: July 6th, 2015

Accepted: December 10th, 2015

Gamboa-Angulo M, Moreno-Escobar JA, Herrera-Parra E, Pérez-Cruz J, Crsitobal-Alejo J y Heredia-Abarca G. *In vitro* Toxicity of Tropical Mexican Micromycetes on Infective Juveniles of *Meloidogyne incognita*. Mexican Journal of Phytopathology 34: 100-109.

DOI: [10.18781/R.MEX.FIT.1507-3](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1507-3)

First DOI published: December 11, 2015.

Primera publicación DOI: 11 de Diciembre, 2015.

Abstract. Culture filtrates and mycelia extracts (methanol and ethyl acetate) from nine selected Mexican tropical fungal strains were tested against second stage juveniles (J_2) of *Meloidogyne incognita*, *in vitro* conditions. The micromycetes *Acremonium kiliense* TA31, *Aspergillus* sp. 2XA5, *Gliocladium* sp. MR41, *Selenosporella* sp. MR26, *Stagonospora* sp. TA34, and four unidentified strains (TA13, 2TA6, 2TA7, and 2XA7) were cultured on Czapeck-Dox medium for 14 days and mycelial mat was separated by filtration for metabolites extraction. *Aspergillus* sp. 2XA5 and *Selenosporella* sp. MR26 showed the highest

Resumen. Filtrados de cultivos y extractos de micelio (acetato de etilo y metanol) de nueve cepas fúngicas Mexicanas tropicales se evaluaron en condiciones *in vitro* contra juveniles de segundo estadio (J_2) de *Meloidogyne incognita*. Los micromicetos *Acremonium kiliense* TA31, *Aspergillus* sp. 2XA5, *Gliocladium* sp. MR41, *Selenosporella* sp. MR26, *Stagonospora* sp. TA34 y cuatro cepas no identificadas (TA13, 2TA6, 2TA7 y 2XA7) se cultivaron en medio Czapeck-Dox durante 14 días y la masa micelial se separó por filtración para la extracción de metabolitos. *Aspergillus* sp. 2XA5 y *Selenosporella* sp. MR26 mostraron la mayor actividad nematóxica, tanto en filtrados de cultivo (100% de mortalidad) como en extractos metanólicos (> 90% de mortalidad). La CE_{50} más baja (0.08 mg mL⁻¹) se obtuvo con el extracto de metanol de la cepa 2XA7 no identificada. Los resultados obtenidos indican que la microbiota tropical tiene potencial como agentes de control biológico de nematodos fitopatógenos.

nematotoxic activity both in culture filtrates (100 % mortality) and methanol extracts (>90 % mortality). The lowest EC_{50} (0.08 mg mL⁻¹) was exhibited by the methanol extract of the unidentified strain 2XA7. The results obtained indicate that tropical mycobiota have potential as biological control agents of plant parasitic nematodes.

Key words: *Aspergillus* sp., nematotoxic, Micromycetes, root-knot nematodes, *Selenosporella* sp.

Meloidogyne incognita is one of the most important root-knot nematode in Mexican agriculture. In Yucatan affects several important crops such as habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.), aloe (*Aloe vera* L.), and tomato (*Solanum lycopersicum* L.), among many others crops (Herrera-Parra *et al.*, 2011). A number of studies have reported that the metabolic production of some fungi could be used as part of management strategy (Xalxo *et al.*, 2013; Bhattacharjee and Dey 2014). These metabolites include caryospomycins (Dong *et al.*, 2007), chitinases, glucanases, peroxidases, viridine, gliotoxin, Trichodermine (Szabo *et al.*, 2013) among others.

However, there is highly necessary development more investigations on fungal potential in this topic (Hernández-Carlos and Gamboa-Angulo, 2011). In this sense, our natural products research group has focused on screening potential regional sources of eco-friendly compounds to be developed as natural nematicides to control this important nematode. As results, the *Selenosporella* sp. MR26 strain has shown to have good effectivity against *M. incognita* (Reyes-Estebanez *et al.*, 2011). However, in this study the nematotoxic effect detected was low (2 %), when strains were grown in fermented rice.

Also, is well documented that microbial biosynthesis of metabolites are in dependence on the substrate and conditions of culture (Shinya *et al.*, 2008; Regaieg *et al.*, 2010). Then, to continue the

Palabras clave: *Aspergillus* sp., nematológico, Micromycetes, nematodos agalladores, *Selenosporella* sp.

Meloidogyne incognita es el nematodo inductor de agallas en la raíz más importante en la agricultura mexicana. En Yucatán, afecta a varios cultivos importantes entre los que destacan: chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.), sábila (*Aloe vera* L.) y tomate (*Solanum lycopersicum* L.), entre otros (Herrera-Parra *et al.*, 2011). Numerosos estudios reportan que metabolitos secundarios producidos por algunos hongos podrían aplicarse como parte de una estrategia para su manejo (Xalxo *et al.*, 2013; Bhattacharjee y Dey 2014). Estos metabolitos incluyen caryospomycinas (Dong *et al.*, 2007), quitinasas, glucanases, peroxidases, viridinas, gliotoxinas, trichoderminas, entre otros (Szabo *et al.*, 2013).

Sin embargo, es necesario realizar más investigaciones relacionadas con el uso potencial de hongos para estos propósitos (Hernández-Carlos y Gamboa-Angulo, 2011). En este sentido, nuestro grupo de investigación de productos naturales, se ha centrado en la detección potencial de fuentes regionales de compuestos naturales para desarrollar compuestos ecológicos, con efecto nematicida para el control de este nematodo. Como resultado, la cepa *Selenosporella* sp. MR26 ha demostrado efectividad contra *M. incognita* (Reyes-Estébanez *et al.*, 2011). Sin embargo, en este estudio el efecto nematológico detectado disminuyó (2 %), cuando la cepa del hongo se cultivó en arroz fermentado.

Se tienen reportes que indican que la biosíntesis de metabolitos por microorganismos, están en función del sustrato y las condiciones de su cultivo (Shinya *et al.*, 2008; Regaieg *et al.*, 2010). Para continuar con la prospección de nuestra colección de hongos, nueve cepas seleccionadas se activaron: *Acremonium kiliense* TA31, *Aspergillus* sp. 2XA5, *Gliocladium* sp. MR41, *Selenosporella* sp. MR26,

Table 1. Effect of fungal culture filtrate (1 mL) and mycelium methanol extracts (0.3 mg mL⁻¹) from micromycetes strains against J₂ of *Meloidogyne incognita*.

Cuadro 1. Efecto del filtrado de cultivo fúngico (1 mL) y extractos metanólicos miceliales (0.3 mg mL⁻¹) a partir de cepas de micromicetos contra J₂ de *Meloidogyne incognita*.

Treatment	Localities	Substrate	Mortality %					
			Culture filtrates		Mycelium extracts			
			24 h	48 h	Methanol		AcOEt	
				24 h	48 h	24 h	48 h	
<i>Acremonium kiliense</i> TA31	1	A	27 cd	37 b	25 c	35 d	7 a	35 b
<i>Aspergillus</i> sp. 2XA5	1	A	50 bc	100 a	52 ab	100 a	0 b	0 d
<i>Gliocladium</i> sp. MR41	2	B	27 cd	37 b	27 c	47 c	0 b	0 d
<i>Selenosporella</i> sp. MR26	3	B	50 bc	100 a	62 a	90 ab	6 a	30 b
<i>Stagonospora</i> sp. TA34	1	A	60 a	100 a	47 ab	86 ab	0 b	0 cd
Unidentified TA13	1	A	20 d	100 a	NE	NE	0 b	0 c
Unidentified 2TA6	1	A	0 e	30 b	0 d	32 d	0 b	0 d
Unidentified 2TA7	1	A	65 a	100 a	47 ab	87 ab	0 b	10 c
Unidentified 2XA7	2	A	35 bc	35 b	51 ab	100 a	0 b	10 c
Blank	-	-	0 e	0 c	0 d	0 e	0 b	0 d
Positive control	-	-	-	100 a	-	100 a	-	100 a
Negative control	-	-	0 e	0 c	0 d	0 e	0 b	0 d

Means with the same letter(s) in the column are not significantly different at $P=0.05$ according to Tukey's studentized range test. Positive control: Vydate (Oxamyl 1 mL L⁻¹). Blank: Czapeck-Dox medium/ organic extract / Medias con la misma letra (s) en la columna no son significativamente diferentes a $P=0.05$ de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Tukey. Control positivo: Vydate (Oxamyl 1 mL L⁻¹ de agua). Blanco: medio Czapeck-Dox / extracto orgánico.

Negative control: water. Nt= no tested. / Control negativo: agua. NE = no evaluados

1: Yucatan 2: Veracruz 3: Tabasco. A: water B: leaves / 1: Yucatán 2: Veracruz 3: Tabasco. A: agua B: hojas.

screening of our fungal collections, nine active strains were chosen (*Acremonium kiliense* TA31, *Aspergillus* sp. 2XA5, *Gliocladium* sp. MR41, *Selenosporella* sp. MR26, *Stagonospora* sp. TA34, and four unidentified strains: TA13, 2TA6, 2TA7, and 2XA7). These strains were grown in Czapeck Dox, a defined liquid medium (Gamboa-Angulo *et al.*, 2012; Reyes-Estebanez *et al.*, 2011).

Therefore, the aim of this study was to test *in vitro* culture filtrates, and mycelia organic extracts (methanol and ethyl acetate) against second juvenile stage (J₂) of *M. incognita*, and to measure the median effective concentration of the most active samples.

MATERIALS AND METHODS

Stagonospora sp. TA34 y cuatro cepas no identificadas (TA13, 2TA6, 2TA7 y 2XA7). Éstas se cultivaron en medio líquido Czapeck Dox (Gamboa-Angulo *et al.*, 2012; Reyes-Estebanez *et al.*, 2011). Por lo anterior, el objetivo de este estudio consistió en evaluar *in vitro* filtrados de cultivos y extractos miceliales (acetato de etilo y metanol) de estos hongos contra el segundo estadio juvenil (J₂) de *M. incognita*, asimismo estimar la concentración efectiva media de los filtrados o extractos con mayor efectividad antagonista.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material fúngico. Cepas fúngicas (Cuadro 1) se activaron; de la colección de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de

Fungal material. Fungal strains (Table 1) from the culture collection of the biotechnology unit of the Scientific Research Center of Yucatán, C.A., were originally isolated from leaves and water samples collected in Tabasco, Veracruz, and Yucatan, Mexico (Reyes-Estébanez *et al.*, 2011; Gamboa-Angulo *et al.*, 2012).

Culture conditions and metabolites fungal extraction. All strains were cultured in potato dextrose agar (PDA) media at room temperature (25 ± 2 °C, 16/8 hours light/darkness) for one week, to obtain a suspension of hyphal fragments-spore suspension (Reyes-Estebanez *et al.*, 2011). One mL of the suspension was transferred to Czapek-Dox liquid medium (200 mL) contained in Roux bottles, with three replicates per isolate. These cultures were incubated for 2 weeks at room temperature, in stationary conditions. Then the culture y s were filtered through filter paper (Whatman® No. 42), to separate the mycelial mat and the culture filtrate. Mycelial mat was lyophilized (Labconco), ground to powder using a glass mortar, and the respective extract was obtained using ethyl acetate (3×, 100 mL for 24 h, each time), followed by methanol (3×, 100 mL for 24 h, each time) to obtain non-polar and polar compounds, respectively. Solvent was eliminated under reduced pressure until dryness to get organic crude extracts which were stored at 4 °C in the dark. Culture filtrates, ethyl acetate extracts (from mycelia and filtrate), as well as methanol extracts were tested for nematotoxic effects (Reyes-Estébanez *et al.*, 2008).

Nematotoxic assay. The nematode inoculum was prepared as previously described (Cristóbal-Alejo *et al.*, 2006). All fungal extracts (300 mg mL^{-1}) were dissolved in 0.25 % tween 20, and culture filtrates (1 mL) were sterilized by filtration through 0.45 μm filter (Millipore) before use in bioassays

Yucatán, A.C., las cuales originalmente se aislaron de hojas y agua muestreadas en Tabasco, Veracruz y Yucatán, México (Reyes-Estébanez *et al.*, 2011; Gamboa-Angulo *et al.*, 2012).

Condiciones de cultivo y extracción de metabolitos de hongos. Todas las cepas se activaron en papa dextrosa agar (PDA) en condiciones de temperatura y luz controlada (25 ± 2 °C, 16/8 horas de luz / oscuridad) durante una semana, para después obtener una suspensión de fragmentos hifales o de esporas (Reyes-Estébanez *et al.*, 2011). Un mL de la suspensión se transfirió a un medio líquido Czapek-Dox (200 mL) contenido en botellas Roux, con tres repeticiones por aislamiento. Estos cultivos se incubaron durante dos semanas a temperatura ambiente en condiciones estacionarias. Enseguida, los cultivos se filtraron a través de papel filtro (Whatman® No. 42), para separar el filtrado del micelio y obtener metabolitos polares. El material micelial se liofilizó (Labconco) y se pulverizó en un mortero de vidrio, para obtener el extracto respectivo mediante acetato de etilo (3×100 mL durante 24 h por tiempo), seguido de metanol ($3 \times$, 100 mL para 24 h, por tiempo) y extraer metabolitos no polares. El disolvente se eliminó a presión reducida hasta deshidratarlos completamente y obtener extractos orgánicos crudos, los cuales se almacenaron a 4 °C en oscuridad. Los filtrados de los cultivos y los extractos miceliales, sirvieron para su evaluación nematotóxico (Reyes-Estébanez *et al.*, 2008).

Ensayo Nematotóxico. El inóculo de nematodos se preparó previamente (Cristóbal-Alejo *et al.*, 2006). Los extractos de acetato de etilo y metanólicos de los hongos se disolvieron (300 mg mL^{-1}) en 0.25 % de Tween 20, y se esterilizaron (1 mL) mediante filtración a través de papel filtro (Millipore) de 0.45 micras antes de su uso en los bioensayos (Cristóbal-Alejo *et al.*, 2006; Candelero-de la

(Cristóbal-Alejo *et al.*, 2006; Candelero-de la Cruz *et al.*, 2015). Initial assessments were conducted with freshly hatched J_2 (10 each replicate) which were placed in suspension, and incubated at room temperature in special glass dishes for J_2 mortality studies. Vydate (Oxamyl, 1 mL L⁻¹ of water) was used as positive control and negative control included distilled water and a blank (Czapeck-Dox medium extracts). Each extract was replicated four times and maintained under laboratory conditions using a completely randomized design. After 24 and 48 h, under a stereoscopic microscopic, the J_2 were touched with a needle and those that did not respond were classified as immobile. All J_2 were counted and classified as mobile and immobile. After 72 h, death of J_2 was confirmed by the transfer of immobile J_2 to distilled water and further examination (24 h).

Dose-inhibitory response curves using a dilution series (0, 50, 100, 200, 300, 400 and 500 mg mL⁻¹) were prepared for three of the most active extract in culture filtrates and extracts (*Aspergillus* sp. 2XA5, *Selenosporella* sp. MR26, and unidentified 2XA7). In the case of culture filtrates, these were diluted to 50 and 25 % (v:v).

Results were reported as percentage of J_2 *M. incognita* mortality. For the analyses of variance data were arcsin transformed [$y = \arcsin(\sqrt{y/100})$] and significant differences among treatments were detected by Tukey's test ($P=0.05$) (Steel and Torrie, 1988). Effective concentrations (EC_{50} and EC_{95}) were obtained by transforming to "Probit" and ten-base logarithms the calculated percent mortality of data from the second assay (Throne *et al.*, 1995).

RESULTS AND DISCUSSION

Cruz *et al.*, 2015). Para los estudios de mortalidad se realizaron con J_2 , (10 cada réplica) recién eclosionados los cuales se colocaron en siracusas especiales de vidrio con los extractos y se incubaron a temperatura ambiente. Se utilizó como control positivo un nematicida; Vydate (Oxamil 1 mL⁻¹), un tratamiento control negativo que incluyó agua destilada y un control blanco (el medio Czapeck-Dox). Cada extracto se repitió cuatro veces y se mantuvo bajo condiciones de laboratorio distribuidos en un diseño experimental completamente al azar. Después de 24 y 48 h, bajo un microscopio estereoscópico, los J_2 que no mostraron movilidad a través de un movimiento cuando se les estimuló la región cefálica se consideraron inmóviles. Después de evaluarse los tratamientos, los J_2 se clasificaron como móviles e inmóviles. Posteriormente después de 72 h, de exposición a los extractos, la mortalidad de los J_2 se confirmó al transferirlos en agua destilada sin los extractos por un periodo de observación de 24 h.

Se emplearon diferentes dosis inhibitoria utilizando diluciones (0, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 mg mL⁻¹) para tres extractos y filtrados con mayor actividad (*Aspergillus* sp. 2XA5, *Selenosporella* sp. MR26 y no identificados 2XA7). En el caso de los filtrados, éstos se diluyeron a 50 y 25 % (v: v).

Los resultados de mortalidad de los J_2 de *M. incognita*, se expresaron en porcentajes. Para los análisis de varianza se tuvieron que transformar mediante la función de arco seno [$y = \arcsin(\sqrt{s/100})$] y cuando se detectaron diferencias significativas entre tratamientos, se hizo la comparación de medias mediante la prueba de Tukey ($P=0.05$) (Steel y Torrie, 1988). Las concentraciones letales (CE_{50} y CE_{95}) se obtuvieron mediante la transformación a logaritmos "Probit" base diez con los datos del porcentaje de mortalidad haciendo un segundo ensayo (Trono *et al.*, 1995).

Nematotoxic activity of culture filtrates and mycelium methanol extracts on *M. incognita* is summarized in Table 1. Ethyl acetate extracts did not show nematotoxic effect (<50 %). The results showed that the extracts from six strains (67 %) immobilize J₂ *M. incognita* in at least one of their filtrate or mycelial extract tested. Five culture filtrates at undiluted concentration of *Aspergillus* sp. 2XA5, *Selenosporella* sp. MR26, *Stagonospora* sp. TA34, and two unidentified strains (TA13 and 2TA7), together two methanol extracts (*Aspergillus* sp. 2XA5 and unidentified 2XA7) displayed good effect (85-100 % mortality) on J₂. Moreover, there was observed that *Aspergillus* sp. 2XA5, followed by *Selenosporella* sp. MR26 displayed the most significant nematotoxic effect, in both, their culture filtrate and methanol mycelia extracts.

The toxicity of the filtrates and methanol extract obtained from liquid culture medium from *Selenosporella* sp. MR26 was higher as compare to the one shown by extracts derived from solid medium (Reyes-Estebanez *et al.*, 2011).

When the juveniles were exposed to three different concentrations of the *Aspergillus* sp. 2XA5, *Selenosporella* sp. MR26 and unidentified 2XA7 active filtrates (Figure 1), there was a concentration-dependent effect. The number of immobile J₂ was higher at 50 % concentration and almost all nematodes were paralyzed with a mean value of 75.8% mortality at 48 h. The highest toxicity was observed with all undiluted filtrates from the active isolates. Similar results were reported for culture filtrate from *Nigrospora* sp., cultivated on Czapeck medium, when tested against juveniles of *M. incognita* (Amin, 2013) The nematicidal action of culture filtrates can be attributed to the production of toxic metabolites or enzymes, as in *F. solani*, where the action was a result of fungal toxins and unused sugar and salt residues present in the culture filtrate (Jain *et al.*, 2008; Regaieg *et*

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La actividad nematotóxica de los filtrados y de los extractos con acetato de etilo y metanólicos fúngicos contra *M. incognita* se resume en la Tabla 1. Los extractos con acetato de etilo no mostraron efecto nematotóxico (<50 %). Los resultados indicaron que los extractos de seis cepas (67 %) inmovilizaron a los J₂ de *M. incognita*. Cinco filtrados sin diluir provenientes de *Aspergillus* sp. 2XA5, *Selenosporella* sp. MR26, *Stagonospora* sp. TA34, y dos cepas no identificadas (TA13 y 2TA7), dos extractos metanólicos (*Aspergillus* sp. 2XA5 y no identificados 2XA7) mostraron efectos significativos en la inmovilidad de los J₂ de los nematodos (mortalidad de 85-100 %). El efecto nematotóxico más significativo se observó con los filtrado y los extractos metanólicos de *Aspergillus* sp. 2XA5, seguido por *Selenosporella* sp. MR26. La toxicidad de los filtrados en medios líquidos y de los extractos metanólicos de *Selenosporella* sp. MR26 fue mayor que cuando éstos se obtuvieron en medio solido (Reyes-Estébanez *et al.*, 2011).

Cuando los juveniles se expusieron en filtrados en tres concentraciones diferentes de *Aspergillus* sp. 2XA5, *Selenosporella* sp. MR26 y la cepa no identificados 2XA7 (Figura 1), el efecto dependió de la concentración. El número de J₂ inmóviles fue superior al 50 % en la más alta concentración de los extractos y al término de 48 h la mayoría de los nematodos se inmovilizaron con promedio de muerte del 75.8 %. La toxicidad más alta se observó con todos los filtrados sin diluir. Resultados similares se reportaron contra juveniles de *M. incognita* con filtrados de *Nigrospora* sp., cultivado en medio Czapeck (Amin, 2013). La acción nematicida de los filtrados se atribuye a la producción de enzimas y otros metabolitos tóxicos; en *Fusarium solani*, la acción tóxica fue asociado por la presencia de toxinas del hongo y no por los compuestos de

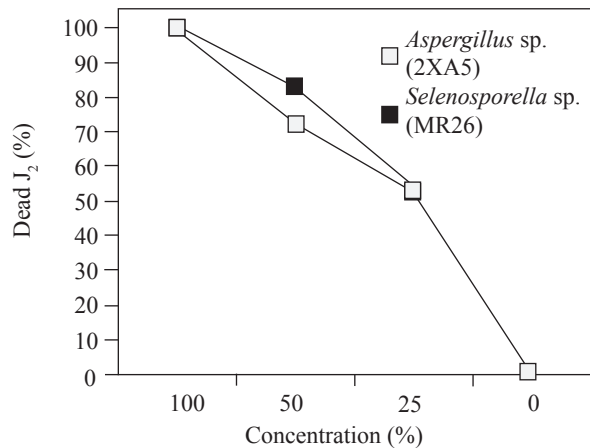


Figure 1. Nematotoxic effect of fungal culture filtrates at different dilutions (0, 25, 50, 100 % v/v) against J_2 of *Meloidogyne incognita* at 48 h.

Figura 1. Efecto nematotóxico de filtrados de cultivos fúngicos a diferentes diluciones (0, 25, 50, 100 % v/v) contra J_2 de *Meloidogyne incognita* a las 48 h.

al., 2010). On the other hand, enzymes could play a key role in fungal infection processes (Segers *et al.*, 1994). Extracellular hydrolytic enzymes such as lipases, chitinases and proteases are considered to be virulence determinants of entomopathogenic fungi and they are involved in complex processes leading to host cuticle penetration and cell digestion (Regaieg *et al.*, 2010).

The results of nematotoxic assays from culture filtrates and mycelia methanol extracts against *M. incognita* showed to be effective with only five polar extracts (Table 1). The best effect was produced by *Aspergillus* sp. 2XA5 and the unidentified strain 2XA7 (100 % mortality), followed by *Selenosporella* sp. MR26 (90 % mortality) at 48 h of exposure. Other strains such as *Stagonospora* sp. TA34 and the unidentified strain 2TA7 were less active than those mentioned above with 47 % nematode mortality at 24 h and up to 80 % mortality at 48 h. This nematotoxic effect was particularly interesting since the fungal strains

sales and azúcares que constituyen el medio de cultivo donde creció (Jain *et al.*, 2008; Regaieg *et al.*, 2010). También, por la presencia de enzimas que desempeñan un papel importante en los procesos de infección de los hongos, las cuales se relacionan con su efecto antagónico (Segers *et al.*, 1994). En este sentido, enzimas hidrolíticas extracelulares tales como; lipasas, quitinasas y proteasas en hongos entomopatógenos se consideran determinantes de virulencia, ya que están involucradas en los procesos de penetración de la cutícula y de la digestión celular (Regaieg *et al.*, 2010).

Los resultados de los ensayos nematotóxicos con los filtrados y los extractos metanólicos de micelio contra *M. incognita* mostraron eficacia solo en cinco cepas, y los extractos con actividad son de tipo polar (Cuadro 1). A las 48 h de exposición, el mejor efecto lo causaron los extractos provenientes de *Aspergillus* sp. 2XA5 y la cepa no identificada 2XA7 (100 % de mortalidad), seguido por *Selenosporella* sp. MR26 (90 % de mortalidad). Otras cepas como *Stagonospora* sp. TA34 y la cepa 2TA7 no identificada, fueron menos activos que los mencionados anteriormente con un 47 % de mortalidad de nematodos a las 24 horas y hasta un 80 % a las 48 h. Este efecto nematotóxico fue particularmente interesante ya que las cepas fúngicas que causan la inmovilidad del nematodo, es resultado de la acción de metabolitos intracelulares (endotoxinas) y extracelulares (exotoxinas). El efecto nematotóxico de la cepa no identificado 2XA7, sólo se produjo en el extracto micelial metanólico y no en el filtrado, lo que indica que la sustancia tóxica no es secretada por hifas fúngicas (endotoxina).

De acuerdo con la Tabla 1, los extractos metanólicos miceliales ejercieron la actividad nematotóxica más alta y se obtuvieron con *Aspergillus* sp. 2XA5, *Selenosporella* sp. MR26, y la cepa no identificada 2XA7. Éstas al estimarse la CE_{50} y CE_{95} (Cuadro 2), la cepa no identificada 2XA7 fue más

could be causing nematode immobility as a result of intracellular (endotoxins) and extracellular metabolites (exotoxins). The nematotoxic effect of the unidentified fungus 2XA7 only occurred in the methanol extract and not in filtrate, indicating that the toxic substance is not secreted by fungal hyphae (endotoxin).

According to Table 1, mycelia methanol extracts with the highest nematotoxic activity obtained from *Aspergillus* sp. 2XA5, *Selenosporella* sp. MR26, and the unidentified strain 2XA7 were chosen for estimation of EC_{50} and EC_{95} (Table 2). The most potent fungal extracts was the unidentified strain 2XA7 with a median effective dose of 0.08 mg mL^{-1} , followed by *Aspergillus* sp. 2XA5 and *Selenosporella* sp. MR26 (EC_{50} values of 0.20 and 0.26 mg mL^{-1} , respectively). These values are good in comparison with other fungal compounds isolated from *Paecilomyces lilacinus* 6029 (LC values of 3.03 mg mL^{-1}) and *Verticillium chlamyosporum* (500 mg L^{-1}) (Khambay *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 2014). Furthermore, it was interesting to detect that *Selenosporella* sp. MR26 produces non polar nematotoxic metabolites when grown on solid fermented rice media (EC_{50} values of 0.91 mg mL^{-1}) and polar in Czapeck-Dox liquid medium (Reyes-Estebanez *et al.*, 2011). Actually, the isolation and identification of the metabolites of *Selenosporella* sp. MR26 are in progress.

Table 2. Effective concentrations (EC_{50} and EC_{95}) of methanol extracts of those strains with the highest nematotoxic activity against J_2 of *Meloidogyne incognita* at 48 h.

Cuadro 2. Concentraciones efectivas (CE_{50} y CE_{95}) de extractos metanólicos de las cepas con la mayor actividad nematotóxica contra J_2 de *Meloidogyne incognita* a 48 h.

Mycelia extract	mg mL ⁻¹	
	EC ₅₀	EC ₉₅
<i>Aspergillus</i> sp. 2XA5	0.201	5.05
<i>Selenosporella</i> sp. MR26	0.259	3.87
Unidentified 2XA7	0.082	2.53

efectiva con una CE_{50} de 0.08 mg mL^{-1} , seguido por los extractos *Aspergillus* sp. 2XA5 y *Selenosporella* sp. MR26 (CE_{50} de 0.20 y 0.26 mg mL^{-1} , respectivamente). Estos valores se consideran buenos en comparación con la efectividad de compuestos aislados de otros hongos como *Paecilomyces lilacinus* 6029 (con valores de CE_{50} de 3.03 mg mL^{-1}) y *Verticillium chlamyosporum* (500 mg L^{-1}) (Khambay *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 2014). Aunque el aislamiento y la identificación de los metabolitos de *Selenosporella* sp. MR26 están en progreso de identificación, es importante mencionar que *Selenosporella* sp. MR26 produce metabolitos nematotóxicos no polares, cuando se cultiva en medios sólidos fermentado de arroz (CE_{50} de 0.91 mg mL^{-1}) y metabolitos polares, cuando se desarrolla en medio líquido Czapeck-Dox (Reyes-Estebanez *et al.*, 2011).

Por otra parte, *Aspergillus* es un género ampliamente conocido con una producción altamente polifacética, cuyos metabolitos activos de varias especies han demostrado propiedades nematotóxicas, como *A. awamori* y *A. niger* contra *M. incognita* y *A. quadrilineatus* contra *M. javanica* (Bath y Wani, 2012). En *A. niger* se identificaron; brevianamide A, itaconitina, ácidos canadensico y micofenólico, y en *A. quadrilineatus* producción de flavoskyrina, dehydrocanadensolida y α -ácido Collatolico (Siddiqui y Futai, 2009; Akhtar y Panwar, 2013).

CONCLUSIONES

En el presente estudio, los datos obtenidos indican que *Aspergillus* sp. 2XA5 y *Selenosporella* sp. MR26 son promisorios para controlar J_2 de *M. incognita*. Ambos hongos producen en sus filtrados y en sus extractos metanólicos miceliales, metabolitos de naturaleza polar; responsables de la actividad nematotóxica. Se requiere de investigaciones

On other hand, *Aspergillus* is an extensively known genus with a highly prolific production of active metabolites, several species have shown nematotoxic properties such as *A. awamori* and *A. niger* against *M. incognita*, and *A. quadrilineatus* against *M. javanica* (Bath and Wani, 2012). From *A. niger* were brevianamide A, itaconitin, canadensic and mycophenolic acids, and *A. quadrilineatus* produces flavoskyrin, dehydrocanadensolide and α -Collatolic acid (Siddiqui and Futai, 2009; Akhtar and Panwar, 2013).

CONCLUSIONS

The experimental data obtained indicate that *Aspergillus* sp. 2XA5 and *Selenosporella* sp. MR26 are the most promissory fungi herein detected to control J₂ of *M. incognita*. Both fungi produce great nematotoxic effect in their culture filtrates and methanol mycelia extracts which indicate polar nature of the metabolites responsible of the activity. Furthermore investigations are required to identify and characterize the molecules responsible for the activity of the potential candidates detected in this study. It will also be necessary to carry out greenhouse trials to tests these nematotoxic metabolites, and finally verify the environmental safety of their use.

Acknowledgements

The authors thank Irma L. Medina-Baizabal, Manuela Reyes, Narcedalia Gamboa, and Sergio Pérez for their valuable technical assistance. This research was supported by CONACyT (Projects No. 47549 and 2009/CB131256), and by Undergraduate Student Fellowship to Jaime Perez Cruz.

LITERATURE CITED

adicionales para identificar y caracterizar las moléculas de los metabolitos potenciales; responsables de la actividad detectada en este estudio. También es necesario realizar ensayos en invernadero y verificar la seguridad ambiental de su uso.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Irma L. Medina-Baizabal, Manuela Reyes, Narcedalia Gamboa y Sergio Pérez, por su valiosa asistencia técnica. Esta investigación fue apoyada por el CONACyT (Proyectos N° 47549 y 2009 / CB131256) y por la beca otorgada a Jaime Pérez Cruz.

~~~~~ Fin de la versión en Español ~~~~~

- Akhtar MS, and Panwar J. 2013. Efficacy of root-associated fungi and PGPR on the growth of *Pisum sativum* (cv. Arkil) and reproduction of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. Journal of Basic Microbiology 53:318–326. <http://dx.doi.org/10.1002/jobm.201100610>
- Amin N. 2013. Investigation of culture filtrate of endophytic fungi *Nigrospora* sp. isolate RS 10 in different concentrations towards root-knot nematode *Meloidogyne* spp. Indian journal of Science and Technology 6:5177–5181. <http://dx.doi.org/10.17485/ijst/2013/v6i9/37130>
- Bhat MY, and Wani AH. 2012. Bio-activity of fungal culture filtrates against root-knot nematode egg hatch and juvenile motility and their effects on growth of mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek) infected with the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. Archives of Phytopathology and Plant Protection 45:1059–1069. <http://dx.doi.org/10.1080/03235408.2012.655578>
- Bhattacharjee R, and Dey U. 2014. An overview of fungal and bacterial biopesticides to control plant pathogens/diseases. African Journal of Microbiology Research 17:1749-1762. <http://dx.doi.org/10.17485/ijst/2013/v6i9/37130>
- Candelero-De la Cruz J, Cristóbal-Alejo J, RA Reyes-Ramírez A, Tun-Suárez JM, Gamboa-Angulo MM, and Ruíz-Sánchez E. 2015. *Trichoderma* spp. promotoras del crecimiento en plántulas de *Capsicum chinense* Jacq. y antagonicas contra *Meloidogyne incognita*. Phytan International Journal of Experimental Botany 84:113-119. Disponible en línea: <http://www.revistaphyton.fundromuloraggio.org.ar/vol84.html>
- Cristóbal-Alejo J, Tun-Suárez JM, Moguel-Catzin S, Marbán-Mendoza N, Medina-Baizabal IL, Simá-Polanco P, Peraza-Sánchez SR, and Gamboa-Angulo MM. 2006. *In vitro* sensitivity of *Meloidogyne incognita* to extracts from native yucatecan plants. Nematropica 36:89–97.

- Disponible en línea: <http://journals.fcla.edu/nematropica/article/view/69732/67392>
- Dong J, Zhu YA, and Song HB. 2007. Nematicidal resorcylics from the aquatic fungus *Caryospora callicarpa* YMF1.01026. *Journal of Chemical Ecology* 33:1115–1126. <http://dx.doi.org/10.1007/s10886-007-9256-7>
- Gamboa-Angulo M, De la Rosa-García SC, Heredia-Abarca G, Medina-Baizabal IL. 2012. Antimicrobial screening of tropical microfungi isolated from sinkholes located in the Yucatan peninsula, Mexico. *African Journal of Microbiology Research* 6:2305–2312. <http://dx.doi.org/10.5897/AJMR11.1129>
- Hernández-Carlos B, Gamboa-Angulo MM. 2011. Metabolites from freshwater aquatic microalgae and fungi as potential natural pesticides. *Phytochemistry Reviews* 10:261–286. <http://dx.doi.org/10.1007/s11101-010-9192-y>
- Herrera-Parra E, Cristóbal-Alejo J, Tun-Suárez JM, Góngora-Jiménez JA, y Lomas-Barrie CT. 2011. Nematofauna nociva (*Meloidogyne* spp.) en cultivos hortícolas tropicales: Distribución y perspectivas de manejo en Yucatán. In: Gamboa AM, Rojas HR (eds.). Recursos genéticos microbianos en la zona Golfo-Sureste de México. Vol 1. México: Subnargem, Sagarpa. Morevalladolid S. de R.L. de C.V., 138–150. [http://www.researchgate.net/publication/256458732\\_Recursos\\_geneticos\\_microbianos\\_en\\_la\\_Zona\\_Golfo-Sureste\\_de\\_Mexico](http://www.researchgate.net/publication/256458732_Recursos_geneticos_microbianos_en_la_Zona_Golfo-Sureste_de_Mexico)
- Jain A, Mohan J, Singh M, and Goswami BK. 2008. Potentiality of different isolates of wilt fungus *Fusarium oxysporum* collected from rhizosphere of tomato against root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Journal of Environmental Science and Health B* 43:686–691. <http://dx.doi.org/10.1080/03601230802388777>
- Khambay BPS, Bourne JM, Cameron S, Kerry BR, and Zaki MJ. 2000. A nematicidal metabolite from *Verticillium chlamyosporium*. *Pest Management Science* 56:1098–1099. [http://dx.doi.org/10.1002/1526-4998\(200012\)56:12<1098::AID-PS244>3.0.CO;2-H](http://dx.doi.org/10.1002/1526-4998(200012)56:12<1098::AID-PS244>3.0.CO;2-H)
- Regaieg H, Ciancio A, Raouani NH, Grasso G, and Rosso L. 2010. Effects of culture filtrates from the nematophagous fungus *Verticillium leptobactrum* on viability of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26:2285–2289. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-010-0397-4>
- Reyes-Estebanez M, Heredia-Abarca G, y Gamboa-Angulo MM. 2008. Perfil biológico de hongos anamórficos del sureste de México. *Revista Mexicana de Micología* 28:49–56. Disponible en línea [http://revistamexicanademicrobiologia.org/wp-content/uploads/2009/10/RMM\\_2009\\_28\\_049-056.pdf](http://revistamexicanademicrobiologia.org/wp-content/uploads/2009/10/RMM_2009_28_049-056.pdf)
- Reyes-Estebanez M, Herrera-Parra E, Cristóbal-Alejo J, Heredia-Abarca G, Canto-Canché B, Medina-Barizabal BI, and Gamboa-Angulo M. 2011. Antimicrobial and nematicidal screening of anamorphic fungi isolated from plant debris of tropical areas in Mexico. *African Journal of Microbiology Research* 5:1083–1089. <http://dx.doi.org/10.5897/AJMR11.121>
- Segers R, Butt TM, Kerry BR, and Peberdy JF. 1994. The nematophagous fungus *Verticillium chlamyosporium* produces a chymoelastase-like protease which hydrolyses host nematode proteins *in situ*. *Microbiology* 140:2715–2723. <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-140-10-2715>
- Sharma A, Sharma S, and Dalela M. 2014. Nematicidal activity of *Paecilomyces lilacinus* 6029 cultured on Karanja cake medium. *Microbial Pathogenesis* 75:16–20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2014.08.007>
- Shinya R, Aiuchi D, Kushida A, Tani M, Kuramochi K, and Koike M. 2008. Effects of fungal culture filtrates of *Verticillium lecanii* (*Lecanicillium* spp.) hybrid strains on *Heterodera glycines* eggs and juveniles. *Journal of Invertebrate Pathology* 97:291–297. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2007.11.005>
- Siddiqui ZA, and Futai K. 2009. Biocontrol of *Meloidogyne incognita* on tomato using antagonistic fungi, plant-growth-promoting rhizobacteria and cattle manure. *Pest Management Science* 65:943–948. <http://dx.doi.org/10.1080/09583150801896043>
- Steel RDG, and Torrie JH. 1988. Bioestadística. Principios y procedimientos. Segunda edición. McGraw-Hill. DF, México. 662 p.
- Szabó M, Urbán P, Virányi F, Kredics L, and Fekete C. 2013. Comparative gene expression profiles of *Trichoderma harzianum* proteases during *in vitro* nematodes egg-parasitism. *Biological Control* 67: 337–346. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.09.002>
- Throne JE, Weaver DK, and Baker JE. 1995. Probit analysis: Assessing goodness-of-fit based on block transformation and residuals. *Journal of Economic Entomology* 88:1513–1516. <http://jee.oxfordjournals.org/content/88/5/1513>
- Xalxo PC, Karkur D, and Poddar A.N. 2013. Rhizospheric fungal association of root knot nematode infested cucurbits: *in vitro* assessment of their nematicidal potential. *Research Journal of Microbiology* 2: 81–91. <http://dx.doi.org/10.3923/jm.2013.81.91>