

PATOGENICIDAD DE *Meloidogyne arenaria* Y *M. javanica* EN *Phaseolus vulgaris* L. BAJO CONDICIONES SEMICONTROLADAS

PATHOGENICITY OF *Meloidogyne arenaria* AND *M. javanica* ON *Phaseolus vulgaris* UNDER SEMI-CONTROLLED CONDITIONS

Claudia Gallardo^{1*}, Omar Medina¹, Sebastian Agostini¹, Javier Bautista¹, Guillermo Cap² y Andres Nico³

¹Cátedra de Zoología Agrícola. Facultad de Ciencias Agrarias. UNJu. Alberdi 47. San Salvador de Jujuy (4600) Argentina. ²C.E.I. - Gorina - MAIBA - E.E. AMBA - INTA. Calle 501 y 149, J. Gorina - (1897), M. B. Gonnet, Buenos Aires. Argentina. ³Cátedra de Horticultura - Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Calle 60 y 119, La Plata, Bs. As. (1900).

*Autor para correspondencia:

clau@fca.unju.edu.ar

Período de Publicación:

Diciembre 2023

Historial:

Recibido: 26/09/2023

Aceptado: 18/10/2023

RESUMEN

En condiciones semicontroladas bajo invernadero se ensayó la patogenicidad de una población de *Meloidogyne arenaria* y otra de *Meloidogyne javanica* aisladas previamente sobre poroto en las cercanías de Jujuy. Se evaluaron 9 tratamientos resultantes de la combinación factorial de tres cultivares de *Phaseolus vulgaris* ('Leales B40', 'Leales 24' y 'Leales R4') con tres tratamientos de inoculación (Control no inoculado, *M. arenaria* y *M. javanica*). Las plantas se mantuvieron en macetas de cinco kg rellenas con suelo estéril e inoculadas con 4000 hh + jj (huevos+juveniles/planta en los tratamientos correspondientes). El ensayo se mantuvo durante 120 días en invernadero a 23°C (+/-2°C). El experimento se diseñó en bloques completamente aleatorizados con 5 repeticiones por tratamiento. Al cabo del experimento se evaluaron parámetros de crecimiento (peso fresco parte aérea total y raíces y rendimiento en granos) y parámetros poblacionales sobre los tratamientos inoculados (índice de nodulación, población en raíces, población en suelo y factor de reproducción). El análisis del resultado de los parámetros de crecimiento no permitió determinar, en ningún caso, diferencias significativas atribuibles a ninguno de los factores de variabilidad (nematodo y variedad), ni a su interacción. La población final total media de nematodos, en cambio, resultó significativamente más alta en las plantas inoculadas con *M. arenaria* (32917nematodos de raíz + nematodos de suelo/población inicial) que en las inoculadas con *M. javanica* (18571nematodos de raíz + nematodos de suelo/población inicial), considerando la totalidad de los casos, y otro tanto ocurrió para el factor de reproducción (9.2 y 5.3, para *M. arenaria* y *M. javanica*, respectivamente). Las variedades 'Leales B40' y 'Leales 24' resultaron poco resistentes ($4 \leq FR$ (Factor de reproducción) ≤ 10) a ambos nematodos, mientras que 'Leales R4' se mostró moderadamente resistente a *M. javanica* ($FR \leq 4$) y altamente susceptible a *M. arenaria* ($FR \geq 10$).

Palabras clave: nematodos, parámetros de crecimiento, parámetros poblacionales

SUMMARY

Pathogenicity of *M. arenaria* and *M. javanica* populations previously isolated from dry bean plants in Jujuy area was tested in greenhouse under semi-controlled conditions. Nine treatments emerging from the factorial combination of three *Phaseolus vulgaris* ('Leales B40', 'Leales 24' y 'Leales R4') with three inoculation levels (non-inoculated control, *M. arenaria* and *M. javanica*) were tested. Plants were kept in 5 kg pots filled with sterile soil and inoculated with 4000 hh + jj(eggs+youth)/plant in the corresponding treatments. Plants were arranged in a completely randomized blocks design with five replicates for each treatment. After the experiment growth parameters (shoot and root fresh weight and grain yield) and population parameters (gall index, total root population, total soil population and reproduction factor). Analysis of growth parameters led to no establishment of significant differences attributable neither to cultivar and nematode effects nor to their interactions. Total final average population, on the other hand, was significant greater in *M. arenaria* (32917 total root nematodes+ total soil nematodes/initial population) than in *M. javanica* (18571 total root nematodes+ total soil nematodes/initial population) inoculated plants, taking into consideration all the treatments and the same occurred with reproduction factor ((9.2 and 5.3, for *M. arenaria* y *M. javanica*, respectively) 'Leales B40' and 'Leales 24' proved to be low resistant ($4 \leq FR(\text{Reproduction factor}) \leq 10$) to both nematodes, while 'Leales R4' resulted moderately resistant to *M. javanica* ($FR \leq 4$) and highly susceptible to *M. arenaria* ($FR \geq 10$).

Keywords: nematodes, growth parameters, population parameters

INTRODUCCIÓN

Los nematodos fitoparásitos ocasionan serios perjuicios económicos que inciden directamente sobre el rendimiento y la calidad de numerosos cultivos. Poseen una amplia gama de hospederos incluyendo entre ellos a leguminosas de grano. El poroto (*Phaseolus vulgaris* L.) se ubica en el tercer lugar dentro del grupo de legumbres de mayor consumo a nivel mundial. La República Argentina es el quinto productor del continente americano. Dada la importancia que este cultivo presenta dentro del panorama agrícola de la provincia de Jujuy y el alto impacto económico que la infestación por nematodos noduladores puede provocar sobre el poroto y teniendo en cuenta que existen diferentes antecedentes que determinan la capacidad de ciertas especies de nematodos fitoparásitos de establecer relaciones de parasitismo compatibles con el poroto y que afectan el crecimiento y la fisiología de la planta (McSorley et al., 1981; Melakerberhan et al, 1985). Con frecuencia, sin embargo, resulta a menudo difícil determinar si el deterioro de las raíces se debe a la asociación de estas con nematodos fitoparásitos, a otros microorganismos presentes en la rizósfera y factores limitantes o la combinación de todos. Por ello el objetivo del trabajo consistió en la realización de pruebas de patogenicidad con inoculación artificial y bajo condiciones de cultivo semicontroladas. Se utilizaron variedades de poroto empleadas comercialmente en la provincia de Jujuy y se evaluaron parámetros de crecimiento y poblacionales.

MATERIALES Y MÉTODOS

El inóculo para los ensayos se obtuvo a partir de cultivo axénico proveniente de una sola masa de huevos de *Meloidogyne arenaria* y de *M. javanica* respectivamente (Jepson, 1987), aislada a partir de una planta naturalmente infestada proveniente de un cultivo de la localidad de Río Blanco, Jujuy (Gallardo et al., 2018). El inóculo se preparó de la siguiente manera: las raíces fueron picadas en trozos de 2 cm y se colocaron en un recipiente de vidrio con tapa. Se agregó una solución de NaOCl al 5% hasta cubrir totalmente las raíces y se agitó vigorosamente durante 2'. Este contenido se filtró a través de un tamiz de 21 cm de diámetro y 75 μ m de malla encajado sobre otro tamiz de igual diámetro y 5 μ m. Las raíces se lavaron rápidamente tres veces con abundante agua para retirar el exceso de NaOCl. De esta forma los restos vegetales groseros se retuvieron en el primer tamiz, mientras que en el segundo quedaron conservados los huevos y juveniles junto con los restos vegetales más finos. Seguidamente el material retenido en el tamiz más fino (huevos más juveniles) se centrifugó y utilizó para inocular las plantas de poroto. Para la inoculación, se efectuó un orificio de aproximadamente 0,5 cm de diámetro y 2- 4cm de profundidad en el sustrato de las macetas con ayuda de una varilla de vidrio. Sobre el orificio abierto se realizó la inoculación con 4.000 huevos más juveniles de segundo estadio de *M. arenaria* y *M. javanica* sobre plantas de poroto blanco var. 'Leales B40', negro var. 'Leales 24' y colorado 'Leales R4', con 15 días de crecimiento en macetas de 5kg de suelo estéril conteniendo una mezcla de 40 % de arena y 60% de limo. Todas las macetas se mantuvieron durante 120 días en invernadero a 23°C (+/-2°C). Se plantearon los siguientes experimentos: 0 (Control sin nematodos), 1 (*M. arenaria* 4000 huevos + J₂/planta) y 2 (*M. javanica* 4000 huevos + J₂/planta). Cada uno de estos tratamientos se aplicaron a los tres cvs. incluidos en el experimento: blanco, negro y colorado. El experimento se diseñó en bloques completamente al azar con 5 repeticiones por tratamiento.

Con el objeto de evaluar el efecto del parasitismo de las especies de nematodos endoparásitos sobre el crecimiento de las plantas, se registraron al finalizar el ensayo los siguientes parámetros de crecimiento: peso fresco de la planta entera, peso fresco de la raíz y peso total de granos.

Para determinar la reproducción de cada una de las especies se procedió a determinar la población final (Pf) de los nematodos contenidos en cada maceta. Esta población final resultó de la suma del número de nematodos presentes en la raíz (N_r) más el número de nematodos presentes en el suelo (N_s). Ambos parámetros se calcularon realizando el recuento directo sobre las extracciones realizadas siguiendo el método de centrifugación descrito por Jenkins (1964). El factor o índice de reproducción se calculó mediante la siguiente fórmula: $FR = (N_r + N_s) / P_i$ (donde P_i = población inicial inoculada en cada maceta, o sea 4000).

Seguidamente las raíces cortadas se colocaron en frascos de vidrio durante 10 minutos para tinción de las masas de huevo con Ploxine B (Omweaga et al., 1988). Luego se retiraron, se eliminó el exceso de agua y colorante y se colocaron en cajas de Petri para su conteo. Una vez teñidas las masas se determinó el índice de nodulación (IN) de acuerdo a la escala propuesta 1-10 por Bridge y Page (1980). Posteriormente, sobre trozos aislados de la raíz, se calculó el número de masas de huevo por gr de raíz (mdh/gr).

Los datos correspondientes al crecimiento de la planta y el crecimiento de la raíz fueron analizados mediante ANOVA y test de Tukey, para comparación de medias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Entre todos los parámetros de crecimiento y poblacionales evaluados los únicos que presentaron un valor significativo ($p \geq 0,05$) para el valor del estadístico "F" en el ANOVA fueron el número total de nematodos totales en maceta y el factor de reproducción cuando la fuente de variabilidad considerada fue la especie de nematodo inoculado (Tablas 1 y 2).

Tabla 1: Probabilidad de estadístico “F” para los parámetros de crecimiento evaluados según la fuente de variabilidad considerada.

Fuente de variabilidad	Peso fresco parte aérea	Peso fresco de raíz	Rendimiento
Nematodo (A)	0.77	0.75	0.07
Variedad de poroto (B)	0.92	0.57	0.08
Interacción A*B	0.40	0.25	0.47

Tabla 2: Probabilidad de estadístico “F” para los parámetros poblacionales evaluados según la fuente de variabilidad considerada.

Fuente de variabilidad	Índice de agallamiento	Nº de agallas	Vermiformes totales en suelo	Huevos + vermiformes totales en raíz	Nematodos totales en maceta	Factor de reproducción
Nematodo (A)	0.47	0.37	0.13	0.08	0.04	0.04
Variedad de poroto (B)	0.10	0.13	0.35	0.14	0.17	0.17
Interacción A*B	0.79	0.42	0.09	0.22	0.26	0.26

Las plantas de la variedad ‘Leales B40’ inoculadas con *M. arenaria* registraron los mínimos valores medios, tanto para peso fresco de parte aérea, peso fresco de raíz como rendimiento de granos (16,3 g, 2,3 g y 0,3 g, respectivamente) (Tabla 3). Las plantas de la misma variedad no inoculadas, por su parte, verificaron el máximo peso fresco medio de la parte aérea (29 g) y el máximo rendimiento medio en granos (5,6 g). El máximo peso fresco medio de raíz, en tanto, se verificó para las plantas de la variedad ‘Leales R4’ inoculadas con *M. arenaria* (9,0 g). En ningún caso las diferencias entre los diferentes tratamientos resultaron significativas, independientemente de la fuente de variabilidad que se considerara ($P \geq 0,05$).

Tabla 3: Valores medios de los parámetros de crecimiento

Tratamiento	Peso fresco de parte aérea (g)	Peso fresco de raíz (g)	Rendimiento de granos (g)
Considerando sólo la variedad			
Blanco	21.9 n.s.*	5.4 n.s.	2.7 n.s.
Colorado	22.4 n.s.	7.1 n.s.	2.8 n.s.
Negro	23.6 n.s.	6.4 n.s.	4.9 n.s.
Considerando sólo la especie de nematodo			
Control	22.7 n.s.	6.8 n.s.	4.9 n.s.
<i>M. arenaria</i>	21.1 n.s.	5.6 n.s.	2.5 n.s.
<i>M. javanica</i>	24.1 n.s.	6.5 n.s.	3.1 n.s.
Considerando las interacciones			
Nematodo	Variedad		

Control	Blanco	29.0 n.s.	8.3 n.s.	5.6 n.s.
Control	Colorado	18.2 n.s.	5.6 n.s.	3.7 n.s.
Control	Negro	21.0 n.s.	6.6 n.s.	5.5 n.s.
<i>M. arenaria</i>	Blanco	16.3 n.s.	2.3 n.s.	0.3 n.s.
<i>M. arenaria</i>	Colorado	23.2 n.s.	9.0 n.s.	2.6 n.s.
<i>M. arenaria</i>	Negro	23.7 n.s.	5.6 n.s.	4.5 n.s.
<i>M. javanica</i>	Blanco	20.4 n.s.	5.6 n.s.	2.3 n.s.
<i>M. javanica</i>	Colorado	25.9 n.s.	6.8 n.s.	2.1 n.s.
<i>M. javanica</i>	Negro	26.1 n.s.	7.1 n.s.	4.8 n.s.

*n.s. = las diferencias entre medias que ocupan una misma columna no difieren significativamente entre sí

Los resultados de nuestro experimento no permitieron reconocer efectos de la inoculación con nematodos sobre ninguno de los parámetros de crecimiento considerados, incluido el rendimiento. Puede argumentarse que la duración del experimento y el confinamiento de la rizósfera al volumen de la maceta no hayan permitido expresar las diferencias entre los tratamientos inoculados y el control hasta que alcanzaran un grado significativo. Mullin et al., (1991) encontraron que plantas de poroto de las variedades Calima y PVA 916 infestadas con una población mixta de *M. javanica* y *M. incognita* veían reducido significativamente su rendimiento en un ensayo llevado a cabo a campo que se mantuvo establecido hasta que las plantas hubieran cumplido su ciclo completamente. Sin embargo, Santos et al., (2012) en un ensayo desarrollado en condiciones bastante similares a las del presente trabajo (macetas de 2 l inoculadas con 2000 hh + jj de *M. incognita* y *M. javanica*) pudieron observar sobre siete cultivares diferentes de poroto que en todos los casos las diferentes variables de crecimiento evaluadas presentaban valores significativamente más altos en los controles respecto a los tratamientos inoculados. Probablemente alguno de los factores adoptados durante la prueba de patogenicidad deba ser revisado para comprobar si la ausencia de diferencias significativas entre el crecimiento de los controles y los tratamientos inoculados se mantiene.

La totalidad de las plantas inoculadas en el ensayo presentaron nodulación evidente en sus raíces en grado variable entre un índice de 3 (cv. 'Leales B40 inoculado con *M. javanica*) y otro de 4.4 ('Leales R4 inoculado con *M. arenaria*) (Tabla 4), sin que se registraran diferencias significativas entre ninguno de los valores ($P \geq 0,05$). El tratamiento de poroto negro 'Leales 24' inoculado con *M. arenaria* presentó los valores más altos de número de huevos y juveniles totales en raíz (36630), mientras que el menor de estos valores se registró en el poroto colorado 'Leales R4' inoculado con *M. javanica* (9224). La variedad de poroto colorado 'Leales R4' inoculada con *M. arenaria* mostró los máximos valores de individuos totales en el total de la maceta y, consiguientemente, de factor de reproducción (41696 y 11.5), mientras que los valores más bajos de este parámetro se verificaron cuando la misma variedad se inoculó con *M. javanica* (13378 y 4.1). Las únicas diferencias significativas ($P \geq 0,05$) se encontraron en estos dos mismos parámetros, pero cuando se consideró como fuente de variabilidad la especie de nematodo por sí sola, sin intervención de las interacciones. *M. arenaria* arrojó un número de especímenes por maceta significativamente más alto ($P \geq 0,05$) que *M. javanica* (32917 y 18571, respectivamente) y otro tanto ocurrió con el factor de reproducción (9.2 vs. 5.3). Estos altos valores muestran que el monocultivo de poroto, o la rotación del mismo con otras especies comparables en su grado de susceptibilidad, determinarían la ocurrencia permanente de altas densidades de inóculo del patógeno en el suelo que podrían comprometer seriamente a cultivos que pudieran ver su crecimiento más afectado. Esto es particularmente grave si se considera el amplísimo rango de hospedantes que muestran ambas especies. Si bien, a falta de una variedad de comprobada resistencia que pudiera ser empleada como patrón, no se puede establecer una comparación estricta entre los valores de factor de reproducción obtenidos en nuestro trabajo y aquellos documentados previamente (Moura y Regis, 1987) cabe aproximar que las variedades 'Leales B40' y 'Leales 24' son poco resistentes a cualquiera de las dos especies de nematodos

($4 \leq FR \leq 10$). La variedad 'Leales R4', en cambio, es moderadamente resistente a *M. javanica* ($FR \leq 4$) y altamente susceptible a *M. arenaria* ($FR \geq 10$). Esta última circunstancia enfatiza sobre el hecho de que la identificación de los nematodos agalladores a nivel de género resulta en muchos casos fundamental para la toma de decisiones sobre los cultivos y variedades a elegir en una determinada rotación.

Tabla 4: valores medios de los parámetros poblacionales

TRATAMIENTO	Índice de nodulación	HH + jj totales en raíz	HH + jj/cc suelo	HH + jj totales en suelo	HH + jj totales en maceta	Masas de huevos totales	Factor de reproducción	
Considerando sólo la variedad								
Blanco	3.1 n.s.*	11831 n.s.	179.19 n.s.	5375.6 n.s.	17206 n.s.	38.8 n.s.	4.3 n.s.	
Colorado	4.1 n.s.	22171 n.s.	178.85 n.s.	5365.5 n.s.	27537 n.s.	69.4 n.s.	6.9 n.s.	
Negro	3.6 n.s.	28936 n.s.	118.40 n.s.	3552.1 n.s.	32488 n.s.	100.5 n.s.	8.1 n.s.	
Considerando sólo la especie de nematodo								
<i>M. arenaria</i>	3.7 n.s.	27254 n.s.	188.77 n.s.	5663.0 n.s.	32917 a ¹	80.6 n.s.	9.2 a	
<i>M. javanica</i>	3.5 n.s.	14705 n.s.	128.86 n.s.	3865.8 n.s.	18571 b	59.9 n.s.	5.3 b	
Considerando las interacciones								
Nematodo	Variedad							
<i>M. arenaria</i>	Blanco	3.2 n.s.	10013 n.s.	257.96 n.s.	7738.9 n.s.	17752 n.s.	28.6 n.s.	4.4 n.s.
<i>M. arenaria</i>	Colorado	4.4 n.s.	35119 n.s.	219.25 n.s.	6577.4 n.s.	41696 n.s.	90.3 n.s.	10.4 n.s.
<i>M. arenaria</i>	Negro	3.6 n.s.	36630 n.s.	89.09 n.s.	2672.6 n.s.	39303 n.s.	122.4 n.s.	9.8 n.s.
<i>M. javanica</i>	Blanco	3.0 n.s.	13648 n.s.	100.41 n.s.	3012.2 n.s.	16661 n.s.	51.5 n.s.	4.2 n.s.
<i>M. javanica</i>	Colorado	3.8 n.s.	9224.0 n.s.	138.45 n.s.	4153.6 n.s.	13378 n.s.	48.4 n.s.	3.3 n.s.
<i>M. javanica</i>	Negro	3.6 n.s.	21242 n.s.	147.72 n.s.	4431.6 n.s.	25674 n.s.	78.2 n.s.	6.4 n.s.

*n.s. = las diferencias entre medias que ocupan una misma columna no difieren significativamente entre sí

¹Valores en la misma columna y correspondientes a la misma fuente de variabilidad que comparten entre sí la misma letra no presentan diferencias significativas entre sí.

CONCLUSIONES

- Este trabajo constituye el primer estudio de patogenicidad de nematodos pertenecientes al género *Meloidogyne* sobre *P. vulgaris* en el departamento Palpalá, provincia de Jujuy.

- Las tres variedades comerciales de poroto resultaron positivas a la inoculación de los nematodos agalladores ensayados.

BIBLIOGRAFÍA

- Bridge, J.; Page, S.L.J. (1980). Estimation of root-knot nematodes infestation levels on roots using a rating chart. *Tropical Pest Management* 26:296-298.
- Gallardo, C., Achinelly, M. F., Cap, G., Nico, A., Brito, J. A. (2018). Molecular identification of *Meloidogyne* spp. infecting beans (*Phaseolus vulgaris*) in Argentina. Trabajo presentado en el 50th Annual Meeting/ Organization of Nematologists of Tropical America. Arequipa, Perú, 19 al 23 de agosto de 2018. *Nematropica* 48: 16.
- Jenkins W R. (1964). A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Dis. Rep.* 48:692
- Jepson, S. (1987). Identification of Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne* species). CAB International, Wallingford, UK. 265 pp.
- McSorley, R.; Pohronezny, K. y Stall, W.M. (1981). Aspects of nematode control on snap bean with emphasis on the relationship between nematode density and plant damage. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 94, 134-136.
- Melakerberhan. H. Brooked, R. C.; Webster, J. M. y D'auria, J. M. (1985). The influence of *Meloidogyne incognita* on the growth, physiology and nutrient content of *Phaseolus vulgaris*. *Physiological Plant Pathology*, 26,259-268.
- Moura, R.M.; Regis, E.M.O. (1987). Reações de cultivares de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) em relação ao parasitismo de *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* (Nematoda: Heteroderidae). *Nematologia Brasileira*, 11: 215-225.
- Mullin, B. A., Abawi, G.S., Pastor-Corrales, M. A.; Kornegay, J. L. (1991). Root-knot nematodes associates with beans in Colombia and Peru and related yield loss. *Plant Dis.* 75:1208-1211.
- Omwega, C. O., Thomason, I. J., and Roberts, P. A. (1988). A non-destructive technique for screening bean germplasm for resistance to *Meloidogyne incognita*. *Plant Dis.* 72, 970-972.
- Santos, L.N.S.; Alves, F.R.; Belan, L.L.; Cabral, P.D.S.; Matta, F.P.; Jesus Junior, W.C.; Moraes, W.B. (2012). Damage quantification and reaction of bean genotypes (*Phaseolus vulgaris* L.) to *Meloidogyne incognita* race 3 and *M. javanica*. *Summa Phytopathologica*, v.38, n.1, p.24-29, 2012.