

Efecto de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (Goddard) Zare y Gams como endófito facultativo en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)



Effect of *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (Goddard) Zare & Gams as facultative endophytic fungus on bean (*Phaseolus vulgaris* L.) <http://opn.to/a/pszEu>

Jersys Arévalo Ortega ^{1*}, Miguel Ángel Hernández Socorro ¹, Alexis Lamz Piedra ², Nivian Montes de Oca Martínez ¹, Leopoldo Hidalgo-Díaz ¹

¹Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Carretera de Jamaica y Autopista Nacional. Apartado 10. 32700, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

²Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). Carretera de Tapaste km 3½, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

RESUMEN: El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la cepa IMI SD 187 de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* como endófito en la promoción del crecimiento de plantas de frijol negro cultivar 'Cuba Cueto 25-9' (CC 25-9N). Se realizaron dos experimentos, uno en condiciones *in vitro* y otro en casa de vegetación. *In vitro*, se aplicó una mezcla de esporas del hongo y arcilla mediante recubrimiento de las semillas en diferentes dosis: 1, 5, 10 y 15 % respecto al peso total de las semillas. Las semillas desinfectadas sin recubrir fueron el control negativo y el control positivo las semillas recubiertas con arcilla (15 %). Se compararon los parámetros asociados a la germinación en cada tratamiento. En casa de vegetación se evaluó la aplicación del hongo mediante recubrimiento de semillas o al sustrato en suspensión y la combinación, teniendo en cuenta la colonización de la cepa en la rizosfera y el crecimiento vegetal sobre sustrato suelo: abono orgánico (3:1 v/v). La cepa incrementó los parámetros asociados a la germinación *in vitro* de semillas de frijol, con un efecto significativo en la longitud del hipocotilo y la masa fresca de las plántulas. Con dos aplicaciones se logró una elevada colonización en la raíz, con un crecimiento endofítico de 16,67 % en 30 días y adelantó la germinación en dos días. Se observó una tendencia a incrementar los parámetros número de hojas trifoliadas, longitud del tallo, masa fresca y seca aérea, y masa fresca de raíz, en diferentes tratamientos con el hongo respecto al control.

Palabras clave: colonización endofítica, hongo nematófago, promoción del crecimiento vegetal.

ABSTRACT: The aim of this work was to evaluate the effect of the strain IMI SD 187 of *P. chlamydosporia* var. *catenulata* as an endophyte on plant growth promotion of the black bean cv. 'Cuba Cueto 25-9' (CC 25-9 N). Two experiments were carried out, *in vitro* and under greenhouse conditions. *In vitro*, the bean seeds were coated with a mixture of the fungal spores and clay at different doses: 1, 5, 10 and 15% respect to the total weight of the seeds. A negative control with only disinfected seeds and a positive control of seeds coated with the clay (15 %) were used. The germination associated parameters in each treatment were compared. In the greenhouse experiment, the application of the fungus was evaluated by coating the seeds, applying a fungal suspension to the substrate, or by combining them, taking into account the rhizosphere colonization by the strain and the plant growth on the soil: organic fertilizer (3:1 v/v) substrate. The strain IMI SD 187 increased the *in vitro* germination parameters of the bean seeds, with a significant effect on hypocotyl length and fresh plant weight. High root colonization was achieved with two applications of the fungus, the endophytic root colonization was 16,67 % in 30 days and seed germination was advanced in two days. There was a tendency to increase the parameters number of trifoliolate leaves, shoot length, fresh and dry plant weight, and fresh root weight, in different treatments with the fungus compared with the control treatment.

Key words: nematophagous fungus, endophytic colonization, plant growth promotion.

*Autor para correspondencia: Jersys Arévalo Ortega. E-mail: jersys@censa.edu.cu

Recibido: 08/07/2018

Aceptado: 27/08/2019

INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una leguminosa importante por su amplia distribución en los cinco continentes y por ser complemento nutricional indispensable en la dieta alimenticia en países de Centro y Suramérica (1).

En Cuba constituye uno de los principales cultivos con una alta demanda popular, por lo que se cultiva a lo largo y ancho del país, incluyendo el sector estatal y no estatal. Durante 2016 se destinaron en el país unas 27 485 ha para su cultivo (2); sin embargo, su producción exige alta disponibilidad de nutrientes y es muy sensible a la proliferación de plagas y enfermedades que generan pérdidas entre 10 y 100 % (3), entre los que se incluyen especies de nematodos fitoparásitos del género *Meloidogyne* (4).

El aumento de la productividad del cultivo se basa en la aplicación de fertilizantes y plaguicidas químicos, costosos y tóxicos, que conllevan a consecuencias sobre la salud humana y efectos perjudiciales sobre el medio ambiente. Actualmente se recomiendan estrategias que promuevan los niveles productivos, así como su calidad sin dañar los agroecosistemas (5).

Una de las alternativas es la asociación con microorganismos simbioses que protegen y benefician a las plantas de forma natural, como *Rhizobium*, que permite la fijación del nitrógeno atmosférico (6), y los hongos micorrízicos arbusculares, que contribuyen a la absorción de nutrientes y agua del suelo, los cuales benefician la productividad del cultivo (7). Otros microorganismos, particularmente los hongos endófitos, reciben una creciente atención en los últimos años, debido a su potencial económico en la agronomía como agentes de control biológico y como promotores del crecimiento vegetal (8).

En este sentido, el hongo nematófago *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare y Gams constituye una alternativa que puede promover los niveles productivos en diferentes cultivos, mediante la elucidación de mecanismos de defensa y la promoción del crecimiento en las plantas (9,10). Además de ser parásito de huevos de nematodos fitoparásitos de diferentes especies, es endófito facultativo de plantas, capaz de colonizar tejidos epidérmicos y corticales de la raíz en cultivos de interés económico y promover

su crecimiento, como el trigo (*Triticum aestivum* L.) (11), la cebada (*Hordeum vulgare* L.) (12) y el tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (13,14).

Este hongo se encuentra ampliamente distribuido en suelos de diferentes zonas edafoclimáticas (15,16) y se informó colonizando naturalmente la rizosfera de plantas de frijol (17). Según estudios anteriores, el establecimiento endofítico de *P. chlamydosporia* confiere diversos beneficios a la planta huésped, como la protección frente a nematodos y patógenos fúngicos (12,18) y la promoción del crecimiento mediante la modulación de respuestas bioquímicas y estructurales de la planta o la regulación de genes implicados en la biosíntesis de fitohormonas (19).

En el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Cuba, se comercializa el producto biológico KlamiC®, producido a partir de una cepa nativa de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* (código de Referencia IMI SD 187). Este producto es efectivo en el manejo de nematodos agalleros en sistemas intensivos de producción de hortalizas (16). Resultados recientes evidencian el comportamiento endofítico de esta cepa como estimulador del crecimiento e inductor de tolerancia en condiciones de salinidad en cultivos hortícolas (20) y un efecto significativo en la promoción del crecimiento de vitroplantas de plátanos y bananos (21). El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la cepa IMI SD 187 de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* como endófito en la promoción del crecimiento de plantas de frijol variedad 'Cuba Cueto 25-9' Negro (CC 25-9 N).

MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos se realizaron en la Unidad de Investigación-Desarrollo de Hongos Agentes de Control Biológico y en aisladores biológicos del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Las semillas de frijol, utilizadas en los experimentos, provenían del germoplasma que se emplea en la colección de trabajo del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). Ambos centros de la provincia Mayabeque, Cuba.

Efecto *in vitro* de *P. chlamydosporia* sobre la germinación de las semillas de frijol

Las semillas de frijol cv. CC 25-9 N se desinfectaron teniendo en cuenta el método utilizado por Zavala-González *et al.* (22) modificado, mediante la inmersión en hipoclorito de sodio al 1 % durante 2 minutos y luego se lavaron tres veces con agua destilada estéril. Posteriormente, las semillas se secaron sobre papel de filtro. Seguidamente se les aplicaron las esporas de *P. chlamydosporia* (IMI SD 187) con una concentración de $1,5 \times 10^7$ clamidosporas.g⁻¹ y $3,0 \times 10^7$ Unidades Formadoras de Colonias por gramo (UFC.g⁻¹) mezclado con arcilla, para facilitar la adhesión del hongo a las semillas de frijol. Las esporas se obtuvieron a partir de 200 g del producto KlamiC® (lote 040316), mediante la separación en un Mycoharvester (modelo MH-1).

La inoculación del hongo se realizó a través de la técnica de recubrimiento de semillas (23) en diferentes dosis: 1, 5, 10 y 15 %, con relación al peso total de las semillas. Se conformaron los tratamientos siguientes:

T1 = Semillas desinfectadas sin recubrir (Control 1)

T2 = Semillas recubiertas con arcilla (15 %) (Control 2)

T3 = Semillas recubiertas con la mezcla de *Pochonia* +arcilla (1 %)

T4 = Semillas recubiertas con la mezcla de *Pochonia* +arcilla (5 %)

T5 = Semillas recubiertas con la mezcla de *Pochonia* +arcilla (10 %)

T6 = Semillas recubiertas con la mezcla de *Pochonia* +arcilla (15 %)

Se estimó la concentración del hongo inoculada a cada semilla de frijol en los tratamientos. Para ello, se partió de 1 g de

semillas recubiertas y se realizaron cuatro diluciones decimales seriadas (1:10) en tubos con 9 ml de agua agarizada (0,05 %) estéril. De cada dilución se sembró una alícuota de 0,2 ml en placas Petri (8 cm Ø) con Agar Papa y Dextrosa (PDA, BioCen: 39 g.L⁻¹). Posteriormente, se incubaron durante cinco días a 25±1°C en la oscuridad, para determinar la concentración de UFC.g⁻¹ de semilla. (Tabla 1)

Las semillas de cada tratamiento se colocaron sobre papel de filtro humedecido con 7 ml agua destilada estéril en placas Petri (15 cm Ø). En cada placa se colocaron 10 semillas de frijol. Se prepararon tres réplicas por cada tratamiento. Posteriormente se colocaron con una disposición al azar a temperatura ambiente promedio de 25,8±3°C y humedad relativa de 62,3±10 %, bajo régimen de luz/oscuridad (16/8 h), durante siete días.

Se evaluó el porcentaje de germinación de las semillas en cada placa durante siete días, mediante inspección visual. Se consideraron como germinadas aquellas semillas que mostraron emergencia de la radícula. Al concluir los siete días de germinación, se evaluaron los parámetros descritos por Valdés *et al.* (24) mediante la determinación de la longitud de radícula (cm) y longitud del hipocotilo (cm), con regla milimetrada; el diámetro de hipocotilo con pie de Rey; el número de raíces secundarias y la masa fresca total de cada plántula (g) en balanza técnica (Sartorius®).

Efecto de *P. chlamydosporia* sobre el crecimiento de las plantas de frijol

Se realizó un experimento en casa de vegetación en macetas plásticas de 1 kg que contenían como sustrato suelo Ferralítico Rojo lixiviado (Nitisol Ródico Eútrico) (25) y abono orgánico de estiércol vacuno, en proporción 3:1

Tabla 1. Distribución del inóculo de *P. chlamydosporia* (IMI SD 187) en las semillas de frijol cv. CC 25-9 N por el método de recubrimiento/ Distribution of the inoculum of *P. chlamydosporia* (IMI SD 187) on seeds of bean cv. CC 25-9 N by coating method

No.	Tratamiento	Concentración (UFC.g ⁻¹)	Concentración (UFC.semilla ⁻¹)
T3	<i>Pochonia</i> +arcilla (1 %)	$1,28 \times 10^4$	$2,17 \times 10^3$
T4	<i>Pochonia</i> +arcilla (5 %)	$2,28 \times 10^5$	$3,43 \times 10^4$
T5	<i>Pochonia</i> +arcilla (10 %)	$5,08 \times 10^5$	$8,96 \times 10^4$
T6	<i>Pochonia</i> +arcilla (15 %)	$7,24 \times 10^5$	$1,36 \times 10^5$

(v/v). El sustrato se esterilizó mediante calor seco en horno a 200°C durante tres horas.

La cepa IMI SD 187 se aplicó mediante recubrimiento de semillas como tratamiento presiembra y al sustrato en suspensión a los cinco días después de la siembra (5 DDS). Las semillas se recubrieron como se describió en el ensayo anterior utilizando la mezcla de clamidosporas y arcilla (en la proporción que se obtuvo como favorable en el experimento *in vitro*). Los tratamientos se conformaron de la siguiente manera:

T1 = Semillas sin recubrir (Control)

T2 = Semillas recubiertas con *P. chlamydosporia*

T3 = Semillas sin recubrir + *P. chlamydosporia* en suspensión a los cinco días (DDS)

T4 = Semillas recubiertas + *P. chlamydosporia* en suspensión a los cinco días (DDS)

A los 30 días posteriores a la siembra, se evaluó la colonización de *P. chlamydosporia* en el sustrato y las raíces en cada tratamiento, mediante el método de dilución y siembra en medio semiselectivo (26). De cada muestra de sustrato, se tomó 1 g y se adicionó a un tubo de ensayo con 9 ml de agua agarizada al 0,05 % estéril. A partir de la suspensión obtenida, se preparó la dilución 10⁻², de la cual se tomaron 0,2 ml y se depositaron sobre dos placas Petri 9 cm (Ø) que contenían medio semiselectivo. Después de 21 días de incubadas las placas a 25±1°C, se calculó la cantidad de UFC.g⁻¹ de sustrato.

Las raíces se lavaron cuidadosamente de forma individual, se secaron con papel de filtro Whatman No 4, se cortaron en secciones de 1 cm y se mezclaron para homogenizar la muestra. Se tomó una submuestra de 1 g, la cual se maceró suavemente en un mortero y se añadió en 9 ml de agua agarizada al 0,05 % estéril. A partir de la suspensión obtenida se tomaron 0,2 ml y se depositaron en dos placas Petri 9cm (Ø) que contenían medio Semiselectivo. Las placas se incubaron durante 21 días a 25±1°C. Posteriormente se contó el número de colonias y se calculó la cantidad de UFC.g⁻¹ de raíz.

A partir de los resultados de UFC.g⁻¹ de raíz, se calculó el área superficial para un peso conocido

de raíz por el método de Tennant (27) y se estimó la cantidad de UFC por cm² de raíz. De acuerdo a los resultados, la colonización extensiva radical del hongo en las raíces se clasificó en: Buena (> 200 UFC por cm² de raíz), Moderada (100-200 UFC por cm² de raíz) y Pobre (< 100 UFC por cm² de raíz), según criterios propuestos por Kerry (28).

Para evidenciar la colonización endofítica, se utilizó el método descrito por Maciá-Vicente *et al.* (29). Las raíces se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1 % durante 1 min y se lavaron con agua destilada estéril tres veces. Posteriormente, se cortaron en secciones de 1 cm y se mezclaron para homogenizar. Se seleccionaron 12 segmentos al azar y se colocaron en placas Petri de 9 cm (Ø) con medio semiselectivo. Las placas se incubaron a 25±1°C durante 14 días para cuantificar los segmentos donde se observó crecimiento del hongo y los resultados se expresaron en porcentaje.

Se realizó un análisis de varianza simple (ANOVA) para cada variable y las medias se compararon mediante la prueba de rango múltiple de Duncan para un nivel de significación de 0,05; se utilizó el paquete estadístico InfoStat versión 2017e (30). Los valores de UFC se transformaron previamente en Log (X+1) y los datos en porcentaje se transformaron en Arcoseno ($\sqrt{X/100}$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto *in vitro* de *P. chlamydosporia* sobre la germinación de las semillas de frijol

Se produjo la germinación del 100 % de las semillas de frijol en todos los tratamientos y el periodo de germinación estuvo entre 1,33 y 2 días como promedio, sin diferencias significativas entre los tratamientos. En cuanto a la velocidad de germinación en el tratamiento T6, se observó el menor valor de seis semillas.día⁻¹, con diferencias significativas respecto a los tratamientos T2 y T3, donde se obtuvo la mayor velocidad de germinación de 9 semillas.día⁻¹. Sin embargo, estos últimos tratamientos no difirieron del resto ni respecto al control. De forma general, se destacan los tratamientos T2, T3, seguido de T5, donde la germinación total de las semillas se logró en un menor tiempo promedio y una mayor velocidad de germinación, aunque sin diferencias

significativas respecto los tratamientos T1 (control) y T4. (Tabla 2)

De manera general, en los parámetros asociados a la germinación *in vitro*, los mayores valores promedios se obtuvieron en el tratamiento T5, donde se aplicó la mezcla de *P. chlamydosporia* y arcilla, en la proporción del 10 %. En este tratamiento, la longitud máxima de radícula fue 16,62 cm, aunque las diferencias no fueron significativas respecto a los tratamientos controles sin el hongo (T1 y T2). Sin embargo, se observó un efecto significativo en la longitud del hipocotilo (11,63 cm) y la masa fresca de la plántula (1,17 g), en comparación con dichos controles. El diámetro del hipocotilo también fue superior (2,01 mm), con diferencias significativas respecto al control de semillas sin recubrimiento (T1). El número de raíces secundarias en el tratamiento T5 difirió significativamente de los tratamientos T2 y T4, donde se obtuvieron los valores más bajos (Tabla 3). Estos resultados indican que el mejor tratamiento con la cepa IMI SD 187 de *P. chlamydosporia* en el recubrimiento de las semillas fue la proporción de 10 %, la cual coincide con la recomendada para hongos micorrízicos arbusculares (23). Además, aseguró adecuados niveles de inóculo de la cepa adheridos a las semillas, lo que pudiera resultar una dosis apropiada para el tratamiento biológico presiembra de frijol con este hongo como endófito, a manera de ofrecer una protección anticipada a las plántulas y promover su crecimiento desde fases tempranas.

Estudios realizados por Zavala-González *et al.* (22) sobre el efecto de nueve cepas de *P. chlamydosporia* en la germinación de semillas de tomate *in vitro* mostraron que este hongo aumentó el crecimiento y el número de raíces secundarias de las plántulas, aunque los resultados difirieron entre las cepas evaluadas. Estos autores observaron que la cepa IMI SD 187 (=Pcat) no estimuló la masa fresca de las plántulas ni la formación de raíces secundarias, lo que presumiblemente pudo estar relacionado, además de la respuesta de la cepa a la especie vegetal, con la cantidad de inóculo y la forma de inoculación.

Efecto de *P. chlamydosporia* sobre el crecimiento de las plantas de frijol

La colonización de la cepa IMI SD 187 de *P. chlamydosporia* en el sustrato y las raíces de las plantas de frijol cv. CC 25-9 N, con diferentes aplicaciones del hongo, alcanzó valores en el orden de $2,83 \times 10^3$ - $4,58 \times 10^3$ UFC.g⁻¹ de sustrato y $7,8 \times 10^2$ - $7,76 \times 10^3$ UFC.g⁻¹ de raíz, con excepción del tratamiento T2, donde no se obtuvo crecimiento del hongo en las placas de medio semiselectivo, lo que significa que está por debajo de 50 UFC. La mayor colonización del sustrato se observó en el tratamiento T4, donde se realizaron dos aplicaciones del hongo mediante recubrimiento a las semillas y en suspensión (5 DDS), aunque las diferencias no fueron significativas. Mientras que, en las raíces se produjo la mayor colonización en este mismo tratamiento, con diferencias significativas

Tabla 2. Germinación *in vitro* de semillas de frijol cv. CC 25-9 N con aplicación de *P. chlamydosporia* (IMI SD 187)/ *In vitro* seed germination of bean cv. CC 25-9 N with application of *P. chlamydosporia* (IMI SD 187)

No.	Tratamiento	Porcentaje de germinación (%)	Periodo de germinación (días)	Velocidad de germinación (semillas.día ⁻¹)
T1	Semillas sin recubrir	100,0	2,00	7,00 ab
T2	Arcilla (15 %)	100,0	1,33	9,00 a
T3	<i>Pochonia</i> +arcilla (1 %)	100,0	1,33	9,00 a
T4	<i>Pochonia</i> +arcilla (5 %)	100,0	2,00	7,00 ab
T5	<i>Pochonia</i> +arcilla (10 %)	100,0	1,67	8,00 ab
T6	<i>Pochonia</i> +arcilla (15 %)	100,0	2,00	6,00 b
	E.E.	0,00	0,11	0,35
	C.V.	0,00	26,8	20,3

E.E: error estándar, C.V: Coeficiente de variación. Letras distintas en la misma columna, indica diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

respecto a T2 y T3. Además, solo en este tratamiento (T4) se constató colonización endofítica del hongo. (Tabla 4)

Para *P. chlamydosporia* se recomienda una concentración de 5×10^3 propágulos.g⁻¹ de suelo para que el hongo ejerza una adecuada actividad en la rizosfera (28,31), lo cual no se logró en los tratamientos a los 30 días de evaluación; sin embargo, la colonización en las raíces fue superior y esta se incrementó cuando se realizó más de una aplicación del hongo.

La colonización de *P. chlamydosporia* (IMI SD 187) en frijol cv. CC-25-9 N, con diferentes aplicaciones del hongo, estuvo en el orden de $3,91 \times 10^2$ - $7,75 \times 10^3$ UFC.g⁻¹ de raíz. La colonización por área de raíz se clasificó como pobre en los tratamientos T2 y T3 con una aplicación del hongo mediante recubrimiento a las semillas o en suspensión (5DDS); mientras que, en el tratamiento T4 con dos aplicaciones,

fue superior a 200 UFC.cm⁻² clasificada como buena según la clasificación dada por Kerry en 2001 (28). (Tabla 5)

En el porcentaje de germinación de las semillas de frijol, en los diferentes tratamientos se observó, de forma general, un incremento importante entre el tercer y el quinto días. A los siete días se observó 100 % de germinación de las semillas en el tratamiento T4, donde recibieron dos aplicaciones de *P. chlamydosporia* (IMI SD 187), dos días antes que los tratamientos T1 (control sin *Pochonia*) y T2 (*Pochonia* en recubrimiento a las semillas); mientras que el tratamiento T3 (*Pochonia* en suspensión) logró un alto porcentaje de germinación a los cuatro días, pero solo alcanzó un porcentaje máximo de 90 %. (Figura 1)

En el crecimiento de las plantas de frijol cv. CC 25-9 N con aplicación de la cepa IMI SD 187 respecto al tratamiento control, se observó un

Tabla 3. Parámetros asociados a la germinación *in vitro* de semillas de frijol cv. CC 25-9 N inoculadas con *P. chlamydosporia* (IMI SD 187)/ *In vitro* parameters associated with seed germination of bean cv. CC 25-9 N inoculated with *P. chlamydosporia* (IMI SD 187)

No.	Tratamiento	Long. Rad (cm) ± E.E.	Long. Hip (cm) ± E.E.	Diám. Hip (mm) ± E.E.	No. Raíces 2rias ± E.E.	Masa fresca plántula (g) ± E.E.
T1	Semillas sin recubrir	16,14 ± 0,67ab	10,23 ± 0,47bc	1,87 ± 0,05b	5,28 ± 0,34a	0,94 ± 0,03b
T2	Arcilla (15 %)	15,21 ± 0,82abc	9,94 ± 0,57c	1,98 ± 0,05ab	3,65 ± 0,39b	1,02 ± 0,06b
T3	<i>Pochonia</i> +arcilla (1 %)	11,93 ± 0,74d	11,02 ± 0,37abc	1,94 ± 0,03ab	4,47 ± 0,31ab	0,96 ± 0,03b
T4	<i>Pochonia</i> +arcilla (5 %)	13,57 ± 0,97cd	10,43 ± 0,43abc	1,91 ± 0,04ab	3,39 ± 0,28b	1,00 ± 0,04b
T5	<i>Pochonia</i> +arcilla (10 %)	16,62 ± 0,73a	11,63 ± 0,38a	2,01 ± 0,03a	5,36 ± 0,38a	1,17 ± 0,03a
T6	<i>Pochonia</i> +arcilla (15 %)	14,01 ± 0,98bcd	11,48 ± 0,39ab	1,97 ± 0,04ab	5,3 ± 0,52a	1,15 ± 0,05a

Long. Rad: longitud de la radícula, Long. Hip: longitud del hipocotilo., Diám. Hip: diámetro del hipocotilo.

Letras distintas en la misma columna, indica diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Tabla 4. Colonización del sustrato y las raíces de frijol cv. CC 25-9 N por *P. chlamydosporia* (IMI SD 187) a los 30 días con diferentes aplicaciones del hongo/ Colonization of the substrate and the roots of bean cv. CC 25-9 N by *P. chlamydosporia* (IMI SD 187) at 30 days with different applications of the fungus

No.	Aplicación de <i>P. chlamydosporia</i>	Colonización de sustrato (x10 ³ UFC.g ⁻¹)	Colonización de raíz (x10 ³ UFC.g ⁻¹)	Colonización endofítica (%)
T2	Recubrimiento	3,25 ± 3,25 ns	< 0,050 c	0,00 ± 0,00 b
T3	Suspensión (5DDS)	2,83 ± 0,98 ns	0,78 ± 0,43 b	0,00 ± 0,00 b
T4	Recubrimiento + suspensión (5DDS)	4,58 ± 2,16 ns	7,76 ± 3,92 a	16,67 ± 0,00 a

incremento de 48,3 % en la masa fresca de la raíz en el tratamiento T2, con una aplicación del hongo mediante recubrimiento a las semillas antes de la siembra; mientras que la aplicación del hongo al sustrato en suspensión 5 DDS logró incrementos en el número de hojas trifoliadas (5,5 %), la masa fresca parte aérea (17,7 %), la masa fresca de raíz (16,9 %) y la masa seca parte aérea (19,6 %). En el tratamiento T4, con ambas aplicaciones, se obtuvo un incremento de 13,7 % en la longitud del tallo. En el resto de las variables del crecimiento no se observó incremento en los tratamientos evaluados. (Figura 2)

En general, a los 30 días de evaluación el hongo no estimuló significativamente los parámetros del crecimiento de las plantas de frijol CC 25-9 N. Lo anterior pudo estar relacionado con que el hongo no haya alcanzado en ese periodo los niveles de colonización adecuados y, de esta manera, lograr una relación equilibrada entre el hongo y la planta que se exprese en la

promoción del crecimiento vegetal o su desarrollo (22). Esto sugiere la evaluación en un periodo superior.

Los resultados obtenidos por Franco-Navarro *et al.* (17) informaron un incremento de la biomasa, aunque no significativo, en plantas de frijol colonizadas con dos cepas mexicanas de *P. chlamydosporia*. Sin embargo, existen antecedentes en campo donde la aplicación de KlamiC® solo, y en combinación con otros productos biológicos, como Azofert® y EcomiC®, incrementó los rendimientos en el cultivo de frijol (Hernández¹, datos no publicados). Por otra parte, resultados obtenidos por Flores-Camacho *et al.* (32) demostraron el efecto positivo de aislamientos de *P. chlamydosporia* frente a nematodos fitoparásitos en frijol.

Los resultados del presente trabajo mostraron que la aplicación de *P. chlamydosporia* (IMI SD 187) a las semillas de frijol, unido a la aplicación del hongo posterior a la emergencia de las

Tabla 5. Colonización de la raíz en frijol cv. CC 25-9 N por *P. chlamydosporia* (IMI SD 187) por área de raíz con diferentes aplicaciones del hongo/ Colonization of *P. chlamydosporia* (IMI SD 187) by root area on bean cv. CC 25-9 N with different applications of the fungus

No.	Aplicación de <i>P. chlamydosporia</i>	Colonización de raíz (x10 ³ UFC.g ⁻¹)	Área de Raíz (cm ²)	Colonización de raíz (UFC.cm ⁻²)	Clasificación
T2	Recubrimiento	< 0,050	2,41	0,0	Pobre
T3	Suspensión (5DDS)	0,39	9,44	41,4	Pobre
T4	Recubrimiento + suspensión (5DDS)	7,75	1,86	4156,1	Buena

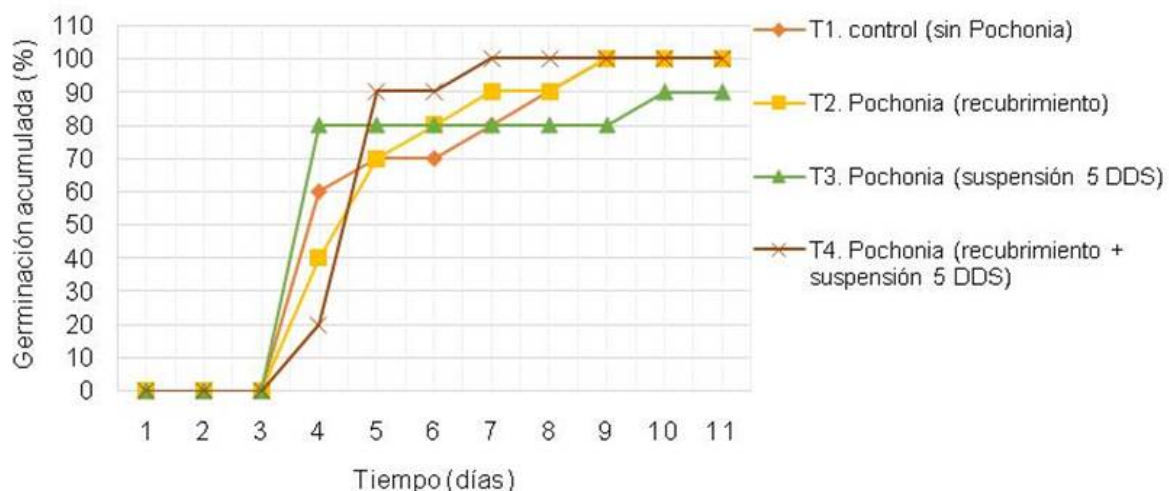


Figura 1. Porcentaje de germinación acumulada de plantas de frijol cv. CC-25-9N en casa de vegetación, con aplicación de *P. chlamydosporia* (IMI SD 187)/ Accumulated germination percentage of bean cv. CC-25-9N in a greenhouse, with application of *P. chlamydosporia* (IMI SD 187)

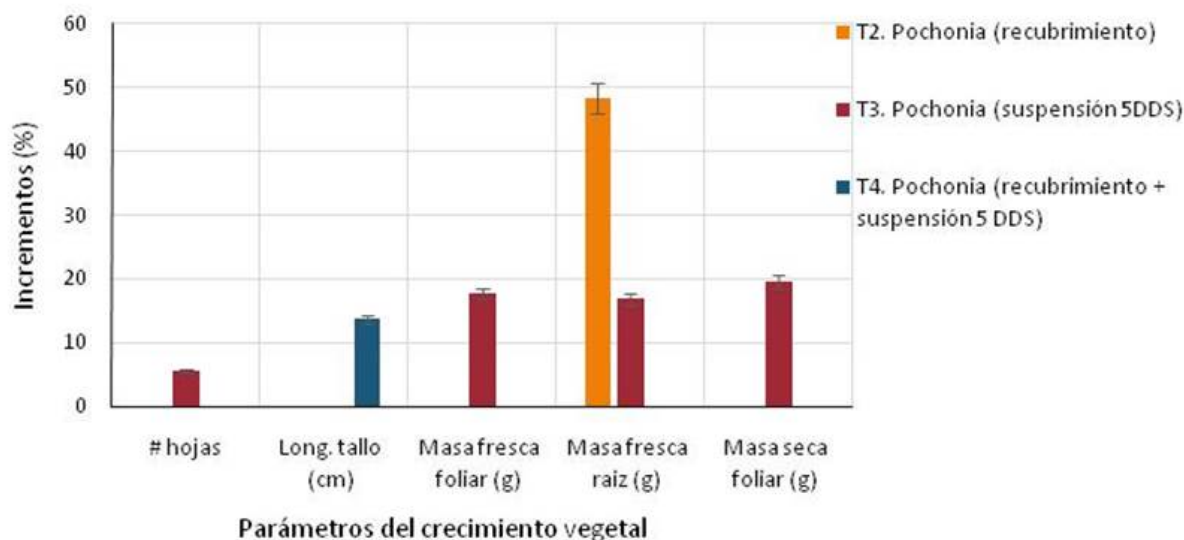


Figura 2. Porcentaje de incremento de *P. chlamydosporia* (IMI SD 187) sobre los parámetros del crecimiento vegetal en frijol cv. CC 25-9 N en casa de vegetación/ Percentage of increment of *P. chlamydosporia* (IMI SD 187) on vegetable growth parameters of bean cv. CC 25-9 N under greenhouse conditions

plantas, permite una buena colonización en las raíces. Se requieren futuras investigaciones en diferentes cultivares de frijol y diferentes aplicaciones del hongo que aseguren la protección en condiciones de campo, con vistas a promover un mejor crecimiento de las plantas y mantener los niveles bajos de nematodos, dado su potencial como endófito facultativo y su acción como nematófago, así como su impacto en el incremento de la productividad y los rendimientos en este cultivo.

REFERENCIAS

- Romero AO, Damián HMA, Rivera TJA, Báez SA, Huerta LM, Cabrera HE. The nutritional value of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and its importance for feeding of rural communities in Puebla-Mexico. *International Research Journal of Biological Sciences*. 2013; 2 (8): 59-65.
- FAOSTAT. Food and Agricultural Organization of United Nations, Rome, Italy. 2016.[Consultado: 9 de febrero de 2017]. En: <http://faostat.fao.org>.
- Beebe S, Skroch PW, Tohme J, Duque MC, Pedraza F, Nienhuis J. Structure of genetic diversity among common bean landraces of middle American origin based on correspondence analysis of RAPD. *Crop Science*. 2000; 40:264-273.
- Hernández D, Rodríguez MG, Miranda I, Hernández H, Holgado R. Reacción de los genotipos BAT-306 y Triunfo-70 de *Phaseolus vulgaris* L. a *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood. *Rev. Protección Veg.* 2016;31(3):224-227.
- Cruz A, Rivero D, Echevarría A, Infante D, Martínez B. *Trichoderma asperellum* en el manejo de hongos fitopatógenos en los cultivos de arroz (*Oryza sativa* L.), frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y soya (*Glycine max* L.). *Rev. Protección Veg.* 2015; 30 (Número Especial): p. 87.
- Nápoles MC, Cabrera JC, Onderwater R, Wattiez R, Hernández I, Martínez L, et al. Señales producidas por *Rhizobium leguminosarum* en la interacción con frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Cultivos Tropicales*. 2016; 37 (2): 37-44. ISSN digital: 1819-4087. DOI: 10.13140/RG.2.1.4466.8405.
- Liriano R, Núñez DB, Barceló R. Efecto de la aplicación de rhizobium y micorriza en el

¹Hernández Miguel Angel. Ing. Agrónomo. Especialista Grupo Fitopatología. Dirección de Sanidad Vegetal. CENSA. (2016). Impacto de la aplicación de Bioinsumos en el cultivo del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Datos sin publicar.

- crecimiento del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad CC-25-9 negro. Centro Agrícola. 2012; 39(4). [Consultado: 10 de mayo de 2017] En: http://cagricola.uclv.edu.cu/descargas/pdf/V39-Numero_4/cag044121877.pdf
8. Kouipou RM, Íñigo PE, Rodríguez B, Wakam L, Fekam F. Biocontrol and growth enhancement potential of two endophytic *Trichoderma* spp. from *Terminalia catappa* against the causative agent of Common Bean Root Rot (*Fusarium solani*). *Biological Control*. 2016;96:8-20. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.01.008>
 9. Bordallo JJ, Lopez-Llorca LV, Jansson HB, Salinas J, Persmark L, Asensio L. Colonization of plant roots by egg-parasitic and nematode-trapping fungi. *New Phytologist*. 2002;154:491-499.
 10. Maciá-Vicente JG, Jansson HB, Talbot NJ, Lopez-Llorca LV. Real-time PCR quantification and live-cell imaging of endophytic colonization of barley (*Hordeum vulgare*) roots by *Fusarium equiseti* and *Pochonia chlamydosporia*. *The New Phytologist*. 2009;182: 213-228.
 11. Monfort E, Lopez-Llorca LV, Jansson HB, Salinas J, Park JO, Sivasithamparamb K. Colonisation of seminal roots of wheat and barley by egg-parasitic nematophagous fungi and their effects on *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and development of root-rot. *Soil Biology and Biochemistry*. 2005; 37:1229-1235.
 12. Maciá-Vicente J G, Rosso LC, Ciancio A, Jansson HB, Lopez-Llorca LV. Colonisation of barley roots by endophytic *Fusarium equiseti* and *Pochonia chlamydosporia*: Effects on plant growth and disease. *The Annals of Applied Biology*. 2009; 155: 391-401.
 13. Escudero N, Lopez-Llorca LV. Effects on plant growth and root-knot nematode infection of an endophytic GFP transformant of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*. *Symbiosis*. 2012; 57 (1):33-42.
 14. Dallemole GR, Grassi de FL, Lopes EA, Soares da SMDC, Megumi KMC, Ferraz S. *Pochonia chlamydosporia* promotes the growth of tomato and lettuce plants. *Acta Scientiarum. Agronomy*. 2015; 37 (4): p. 417.
 15. Arévalo J, Hidalgo L, Martins I, Souza JF, Castro JMC, Carneiro RMDG, et al. Cultural and morphological characterization of *Pochonia chlamydosporia* and *Lecanicillium psalliotae* isolated from *Meloidogyne mayaguensis*. *Tropical Plant Pathology*. 2009; 34(3):158-163.
 16. Hidalgo Díaz L. Investigación, desarrollo e innovación de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* como agente microbiano para el control de nematodos formadores de agallas. *Rev. de Protección Veg.* 2013; 28(3): 238.
 17. Franco-Navarro F, Cid del Prado Vera I, Tejada R, de la Luz M. Aislamiento y Potencial Parasítico de un Aislamiento Nativo de *Pochonia chlamydosporia* en contra de *Nacobbus aberrans* en Frijol. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 2013; 30(2):101-114.
 18. Rosso LC, Colagiero M, Salatino N, Ciancio A. Observations on the effect of trophic conditions on *Pochonia chlamydosporia* gene expression. *Annals of Applied Biology*. 2014; 164 (2):232- 243.
 19. Larriba E, Jaime MDLA, Nislow C, Martín NJ, Lopez-Llorca LV. Endophytic colonization of barley (*Hordeum vulgare*) roots by the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* reveals plant growth promotion and a general defense and stress transcriptomic response. *Journal of Plant Research*. 2015; 128 (4): 665-678.
 20. Ceiro WG. Aportes a las bases científico-técnicas para el establecimiento de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (Kamyschko ex Barron y Onions) Zare y Gams en el manejo de *Meloidogyne* spp. en Sistemas de Producción Protegidos de Hortaliza. (Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas(Universidad Central de Las Villas "Marta Abreu", Cuba. 2015; pp.98.
 21. Hernández MA, Arévalo J, Marrero D, Hidalgo-Díaz L. Efecto de KlamiC(r) en la estimulación del crecimiento de vitroplantas

- de plátanos y bananos. Cultivos Tropicales. 2016; 37 (4): 168-172.
22. Zavala-González GEA, Escudero N, Lopez MF, Aranda MA, Exposito A, Ricaño RJ, et al. Some isolates of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* promote root growth and reduce flowering time of tomato. *Annals of Applied Biology*. 2015; 166 (3): 472-483.
23. Fernández F, Vanega LF, De la Noval B, Rivera R. Producto Inoculante Micorrizógeno. Certificado de autor de Invención. Oficina Nacional de la Propiedad Industrial. Patente No. 22 641. La Habana, Cuba. 2000.
24. Valdés R, Pozo E, Cárdenas M, Jimenez L, Pérez C, Rodríguez R. Efecto del ozono sobre el vigor de semillas de Garbanzo (*Cicer arietinum* L.). *Centro Agrícola*. 2012; 39 (4): 21-26.
25. Hernández A, Pérez J, Bosch D, Castro N. Clasificación de los suelos de Cuba 2015. Edit. Ediciones INCA, Mayabeque, Cuba. 2015; 93 pp..
26. Kerry BR, Bourne JM. A Manual for Research on *Verticillium chlamydosporium*: A Potential Biological Control Agent for Root-Knot Nematodes Ed. International Organization for Biological Control of Noxious Animals and Plants, West Palaearctic Regional Section. 2002; 84 p.
27. Tennant D. A test of the modified line intercepts method of estimating root length. *Journal of Ecology*. 1975 63: 995-1000.
28. Kerry BR. Exploitation of the Nematophagous Fungus *Verticillium chlamydosporium* Goddard for the Biological Control of Root-knot Nematodes (*Meloidogyne* spp.). En: Butt T.M., Jackson C., Magan N. (Ed). *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential*. CAB International, Wallingford. 2001;155-168.
29. Maciá-Vicente VJG, Jansson HB, Mendgen K, Lopez-Llorca LV. Colonization of barley roots by endophytic fungi and their reduction of take-all caused by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Canadian Journal of Microbiology*. 2008; 54 (8):600-609.
30. Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, González L, Tablada M, Robledo CW. InfoStat versión 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Disponible en: <http://www.infostat.com.ar/>
31. Puertas A, Arévalo J, Montes de Oca N, Miranda I, Hidalgo-Díaz L. Efecto de diferentes concentraciones de inóculo de la cepa IMI SD 187 de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* en el control de *Meloidogyne incognita*. *Rev. Protección Veg*. 2006; 21 (2):74-79.
32. Flores-Camacho R, Manzanilla-López RH, Cid del Prado-Vera I, Martínez-Garza A. Control de *Nacobbus aberrans* (Thorne) Thorne y Allen con *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Gams y Zare. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 2007; 25:26-34.

Los autores de este trabajo declaran no presentar conflicto de intereses.

Este artículo se encuentra bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)