

# Investigaciones para el desarrollo del hongo *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* como principio activo del bionemático Klamic®



<https://cu-id.com/2248/v46e18>

## Research for the development of the fungus *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* as an active ingredient of the bionematicide Klamic®

✉ Jersys Arévalo Ortega<sup>1</sup>, ✉ Belkis Peteira Delgado-Oramas<sup>1\*</sup>, ✉ Leopoldo Hidalgo Díaz<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Fitopatología, Departamento de Sanidad Vegetal, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, CENSA. Carretera Jamaica y Autopista Nacional, AP 10, CP 32700, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

<sup>2</sup>BIOTOR Labs, Nicaragua.

**RESUMEN:** El objetivo de este trabajo fue la descripción, en orden cronológico, de todas las investigaciones realizadas para la obtención del producto Klamic®, cuyo principio activo es la cepa IMI SD187 del hongo nematófago *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*. Se resumen todos los estudios realizados en cinco capítulos, que recogen los siguientes aspectos: prospección, identificación y selección de aislamientos potenciales agentes de control biológico (ACB) para el control de nematodos formadores de agallas; la caracterización morfológica, cultural, bioquímica y molecular; los estudios de toxicología y ecotoxicología, como parte de los análisis de seguridad de la cepa IMI SD 187 de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*; el desarrollo de una Guía de Buenas Prácticas de Fabricación del bionemático y el Sistema de manejo y protección de los bancos de la cepa y por último, su aplicación y uso en campo para el control de *M. incognita*.

**Palabras clave:** Bionemático, bioproductos, control biológico, hongos nematófagos.

**ABSTRACT:** The objective of this work was the chronological description of all the research work carried out to obtain Klamic™, a product whose active ingredient is the strain IMI SD187 of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*. All the studies carried out are summarized in five chapters covering the following aspects: prospection, identification, and selection of potential isolates of biological control agents (BCA) for the control of root-knot nematodes; morphological, cultural, biochemical, and molecular characterization; toxicological and ecotoxicological studies as part of the safety analyses of the strain IMI SD 187 of *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*; development of a Good Manufacturing Practices Guide for the bionematicide production and a system of management and protection of the collections of the strain, and, finally, its application and use in the field for *M. incognita* control.

**Key words:** Bionematicide, bioproducts, biological control, nematophagous fungi.

### INTRODUCCIÓN

La primera etapa en el desarrollo de un candidato a producto, cuyo principio activo es un agente de control biológico (ACB), consiste en el aislamiento y selección de una bacteria, hongo, virus o nematodo capaz de interferir en el ciclo biológico de la plaga. En Cuba, solo se informó la presencia de *Pochonia chlamydosporia* colonizando masas de huevos de *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood en el cultivo de la guayaba (1) pero no se realizó ningún estudio de prospección y selección de aislamientos de este hongo.

Por las razones antes mencionadas, se realizaron una serie de estudios para investigar las potencialidades de esta especie como agente de control biológico de nematodos fitoparásitos, su desarrollo como bioproducto a través de un sistema de reproducción masiva con pocos insumos y su aplicación en campo, en diferentes condiciones.

El objetivo de este trabajo fue la descripción, en orden cronológico, de todas las investigaciones realizadas para la obtención del producto Klamic®, cuyo principio activo es la cepa IMI SD187 del hongo nematófago *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*.

### Breve historia de la investigación

El éxito de la investigación se debió, en gran parte, a la formación de diferentes grupos unidos por la colaboración internacional, y tomando como base la incorporación, en cada momento, de múltiples disciplinas y enfoques. El apoyo brindado por Rothamsted Research Institute, específicamente, Nematode Interactions Unit, Department of Plant Pathology and Microbiology, así como Harpenden Local Campaign Committee (Reino Unido de la Gran Bretaña), fue fundamental en los inicios de la investigación. Ambas instituciones brindaron su aporte financiero para que varios de los integrantes del

\*Correspondencia a: Belkis Peteira Delgado-Oramas. E-mail: [bpeteira@censa.edu.cu](mailto:bpeteira@censa.edu.cu), [belkispeteiradelgado@gmail.com](mailto:belkispeteiradelgado@gmail.com)

Recibido: 24/11/2023

Aceptado: 14/12/2023

equipo cubano de investigación (Leopoldo Hidalgo-Díaz, Nivian Montes de Oca y Belkis Peteira Delgado) llevaran a cabo las investigaciones.

Invaluable también, resultó en ese momento la elaboración y ejecución conjunta del proyecto de investigación con la Unión Europea, ICA4-CT-2002-10044, MiCoSPA - Microbial Pest Control for Sustainable Peri-Urban/Urban Agriculture in Latin America, en el cual participaron el Reino Unido, Cuba, México, Holanda y Portugal. Para las investigaciones relacionadas con *Pochonia* y dentro del proyecto antes mencionado, fue muy importante el apoyo del Dr. Brian Kerry, nematólogo de gran experiencia (Fig. 1 y 2) quien fungió como supervisor de muchos de los trabajos que se desarrollaron después.



**Figura 1.** Dr. Brian Kerry. Nematólogo de Reino Unido. La fotografía es cortesía de Rothamsted Research Ltd. y de la Dra. Rosa Manzanilla López. / Dr. Brian Kerry. UK nematologist. Photography is courtesy of Rothamsted Research Ltd. and Dr. Rosa Manzanilla López.



**Figura 2.** Dr. Brian Kerry, en el organopónico de Alamar, La Habana, Cuba, durante reunión del proyecto MiCoSPA. La fotografía es cortesía de Rothamsted Research Ltd. y de la Dra. Rosa Manzanilla López. / Dr. Brian Kerry at Alamar organoponic, Havana, Cuba, during the MiCoSPA project meeting. Photography is courtesy of Rothamsted Research Ltd. and Dr. Rosa Manzanilla López.

Vale destacar, la significativa contribución en las investigaciones relacionadas con *Pochonia* de otros investigadores, profesores y estudiantes extranjeros, que desarrollaron sus estudios en el Instituto de Investigaciones de Rothamsted, como los doctores Rosa Manzanilla, Penny Hirsch, Naresh Nagan, Ivania Esteves y Simon Atkins, entre otros. Algunos de ellos, se desempeñaron como supervisores de las investigaciones y tesis doctorales, derivadas de ellas.

La colaboración internacional se extendió más tarde a la Universidad de Brasilia y Embrapa- Recursos Genéticos e Biotecnología, Brasilia-DF, Brasil, a través de acciones que financió el Consejo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico CNPq y Embrapa. En estas investigaciones participaron, por la parte brasileña, los investigadores Myrian Tigano, Regina M. D. G. Carneiro, S. D. Silva, Marina D. G. Carneiro, Jananina Ferreira, Irene Martins, José Mauro Castro, entre otros.

Posteriormente, se elaboró y aprobó el proyecto internacional titulado Microbial Uptakes for Sustainable management of major banana pests and diseases (MUSA) H2020-SFS-2016-2017, Número de propuesta 727624 (2017-2021) coordinado por el Dr. Aurelio Ciancio. En este proyecto participaron 13 instituciones de diferentes países (Italia, Reino Unido, Bélgica, España, Nigeria, Etiopía Kenya, Costa Rica y Cuba). Los líderes principales, en cada una de las partes, fueron los doctores Aurelio Ciancio, Luis V. Lopez-Llorca, Federico Lopez Moya, Laura Pietrantonio, Javier López-Cepero Jiménez, Jesús Mercado-Blanco, Carmen Gómez-Lama, Dan Bebber, Jasmine Zorrilla, George Mahuku, Denny Coyne, Solveig Haukeland, Henry Wainwright, Luis Ernesto Pocasangre, Belkis Peteira y Mayra G. Rodríguez (Fig. 3).



**Figura 3.** Algunos de los integrantes del proyecto MUSA, durante la reunión anual del proyecto, en el marco del SISA (Seminario Internacional de Sanidad Agropecuaria), Varadero, Cuba, 2019). / Some members of the project MUSA at its annual meeting within the framework of SISA (International Seminar on Agricultural Health), Varadero, Cuba, 2019).

Por otra parte, las investigaciones sobre el tema, también recibieron apoyo financiero en Cuba, a través de diversos proyectos nacionales:

- El proyecto internacional MiCoSPA tuvo su versión nacional en Cuba, liderado por el Dr. Leopoldo Hidalgo.
- Obtención de Bioplaguicidas fungosos de alta calidad para el control de plagas en sistemas sostenibles de agricultura urbana y periurbana. Informe Final; 2008. Contrato PNCT-Biotecnología Agropecuaria. (GEPROD, CITMA, Cuba) 0300235, liderado por el Dr. Hidalgo-Díaz L.
- Introducción de KlamiC, bionematicida a base del hongo *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*, en Sistemas Intensivos de Producción de Hortalizas en Cuba. Informe Final; 2010. Contrato PNCT-Biotecnología Agropecuaria: 00300308, (GEPROD, CITMA, Cuba) líder, Dr. Hidalgo-Díaz L.
- Diagnóstico y manejo de plagas en granos, con énfasis en el desarrollo y uso de productos bioactivos (2013-2016) liderado por el Dr. Leopoldo Hidalgo.
- Nuevos usos del bionematicida KlamiC®, como endófito bioestimulante en diversos cultivos y parásito de otras especies de invertebrados de interés agrícola (2016-2019) guiado por la Dra. Jersys Arevalo.
- El proyecto internacional MUSA, también tuvo su versión nacional en Cuba: Manejo sostenible de plagas importantes de plátano y bananos (2018-2022) encabezado por la Dra. Belkis Peteira.

A continuación se exponen los resultados de estos proyectos.

## CAPÍTULO I: PROSPECCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE AISLAMIENTOS POTENCIALES AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO (ACB) PARA EL CONTROL DE NEMATODOS FORMADORES DE AGALLAS

### Prospección e identificación

En un primer pesquizado, realizado en el periodo comprendido de 1995-1996, Hidalgo-Díaz (2) realizó una prospección en suelos de las dos principales regiones cafetaleras del país: una más seca y cálida al este (Provincia Santiago de Cuba) y otra más húmeda y fría, al centro del país (Provincia Villa Clara). Las muestras fueron recolectadas en 12 sitios diferentes con antecedentes de infestación por *Meloidogyne* spp. (3). Adicionalmente, se obtuvieron muestras de suelo y raíces de tomate infestadas por *Meloidogyne incognita*, en la provincia Mayabeque (4). Los aislamientos se identificaron y describieron con el

uso de las claves de especies de hongos nematófagos. Después, se actualizaron según Zare y Gams (5) y Zare, Gams y Evans (6) quienes reubicaron las especies de hongos nematófagos del género *Verticillium* Ness a los géneros *Lecanicillium* Gams y Zare, y *Pochonia* Batista y Fonseca.

Se obtuvieron 83 aislamientos asociados a un complejo de especies del género *Meloidogyne*, en el cual predominó *M. incognita*, en la región central; mientras que, en la región este, se encontraron en similares proporciones: *M. incognita*, *Meloidogyne enterolobii* Yang y Eisenback (syn. *Meloidogyne mayaguensis* Rammah y Hirschman) y *Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood. De estos aislamientos se identificaron tres especies y dos variedades de hongos nematófagos parásitos facultativos de huevos de nematodos: *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (Goddard) Gams y Zare; *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (Kamyschko ex Barron y Onions) Zare y Gams; *Lecanicillium psalliotae* (Treschow) Zare y Gams y *Pochonia suchlasporium* (Gams y Dackman) Zare y Gams. *P. chlamydosporia* resultó la especie más frecuente con el 90 % de los aislamientos realizados y, dentro de ella, la var. *catenulata* con el 62 % (7). Los aislamientos *P. chlamydosporia* var. *catenulata*, a diferencia de los aislamientos examinados previamente por Gams (8) presentaron gran producción de clamidosporas, con una mayor intensidad en la coloración de las colonias, predominando los colores ocráceos.

En años posteriores, se realizó un segundo pesquizado en diferentes escenarios productivos de cinco provincias de Cuba: La Habana, Mayabeque, Matanzas, Granma y Guantánamo, y en la localidad de Petrolina, Pernambuco, Brasil, en una plantación de guayaba afectada por *M. enterolobii* (9). Este nuevo pesquizado estaba encaminado a ampliar el conocimiento sobre la distribución de estos hongos en Cuba y otras regiones tropicales; así como disponer de un mayor número de aislamientos de *P. chlamydosporia* para completar los estudios de caracterización (10, 11).

Se procesaron, en total, 58 muestras de diferentes regiones edafo-climáticas de Cuba y Brasil. La concentración de las poblaciones nativas de *P. chlamydosporia* estuvo en el rango entre  $3,75 \times 10^1$  y  $2,50 \times 10^2$  UFC.g<sup>-1</sup> de suelo, inferior a las concentraciones informadas en suelos supresores de *Heterodera avenae* Wollenweber ( $5 \times 10^3$  UFC.g<sup>-1</sup> de suelo) bajo monocultivos de cereales en el Reino Unido, por Kerry, Crump y Mullen (12). En cambio, estos resultados coinciden con datos anteriores de poblaciones de este hongo nematófago en suelos cafetaleros de las regiones central y este de Cuba, donde se detectaron concentraciones en el rango de  $1,3 \times 10^1$  y  $5,75 \times 10^2$  UFC.g<sup>-1</sup> de suelo (7).

En todos los casos, los aislamientos, se identificaron de manera preliminar siguiendo la descripción realizada por Zare, Gams y Evans (6) para *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*. En Agar Extracto de Malta (AEM) a los 10 días a 20°C, describieron aspectos, como diámetro de la colonia, textura y color. Se observaron de fiálides simples verticiladas, conidios dispuestos en falsas cabezas en el extremo de las fiálides, predominantemente redondos y elipsoidales, así como la presencia de clamidosporas (Fig. 4).

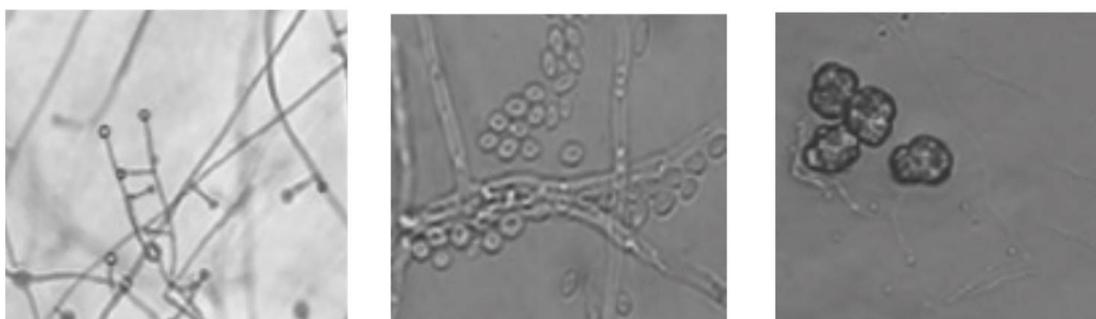
Siguiendo también los criterios descritos por Zare, Gams y Evans (6), se realizó la identificación y descripción de *P. chlamydosporia* var. *catenulata*. Las colonias fueron similares a *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (8). En AEM a los 10 días a 20°C, se anotaron las características del diámetro de la colonia blanca algodonosa, con tonalidad amarilla clara en el centro y bordes regulares. Se observaron fiálides simples verticiladas, conidios dispuestos en cadenas en el extremo de las fiálides, de forma esférica, y la presencia de clamidosporas (Fig. 5).

Finalmente, los aislados cubanos que se identificaron morfológicamente, se seleccionaron teniendo en cuenta su origen, especie, variedad y biotipo, y se depositaron en las colecciones de hongos nematófagos del CENSA (CCC-HN, código Cvc) y del Profesor Brian Kerry, en la Estación Experimental de Rothamsted del Reino Unido (código RRes).

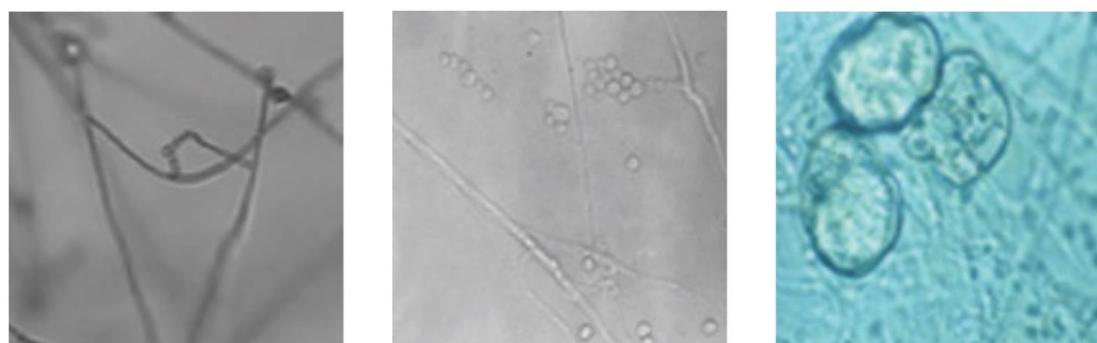
## Selección:

En los estudios de selección, se evaluaron 27 cepas depositadas en las colecciones del CENSA y RRes (23, *P. chlamydosporia*; 3, *L. psalliotae* y 1, *P. suchlasporia* var. *catenulata*) y la cepa de referencia RRes10 (=Vc10) de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (7). El protocolo de selección incluyó un ensayo inicial sobre el efecto de la temperatura en el crecimiento micelial radial y la esporulación de las tres especies en estudio, así como la habilidad para colonizar la rizosfera, parasitar huevos de *M. incognita* y producir clamidosporas.

Se estableció la posición de las cepas de *P. chlamydosporia* sobre la base de su actividad saprofitica (colonización de la rizosfera) la actividad parasítica (parasitismo de huevos) y producción de clamidosporas con un orden de mérito, desde 1 (menor valor) a 19 (mayor valor) a cada cepa, acorde a su actividad. La primera posición la obtuvo la cepa Cvc 108 de la var. *catenulata*, siendo la primera vez que se seleccionaba una cepa de *P. chlamydosporia* var. *catenulata*, como potencial ACB. En este momento, la cepa de seleccionada, se depositó en la colección internacional bajo el código IMI SD 187, al cual nos referiremos a partir de este momento.



**Figura 4.** *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* Características microscópicas: A: conidióforos, B: fiálide simple, C: conidios, D: clamidosporas. / *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* Microscopic characteristics: A: conidiophores, B: single hyalide, C: conidia, D: chlamydospores.



**Figura 5.** *P. chlamydosporia* var. *catenulata* Características microscópicas, A: conidios en cadena. B: conidios, C: clamidosporas. / *P. chlamydosporia* var. *catenulata* Microscopic characteristics, A: conidial chains. B: conidia, C: chlamydospores.

## Capítulo II: Caracterización morfológica, cultural, bioquímica y molecular de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*

### Caracterización Morfológica y Cultural

Posteriormente, se procedió a realizar la caracterización morfológica de las colonias en diferentes medios de cultivo (Papa Dextrosa Agar, Agar Extracto de Malta, Agar Harina de Maíz, Medio semi selectivo y Medio AP - 50). (Fig. 6, 7, 8)

Los medios estudiados, hasta el momento, son los más utilizados para el cultivo e identificación de esta especie, aunque mediante la observación visual, son muy difíciles de diferenciar las variedades *chlamydosporia* y *catenulata*.

De forma general, en cultivos jóvenes, el hongo es de color blanco, aunque la cepa en todos los medios estudiados genera un pigmento difusible de

color amarillo, el cual se observa en el reverso de la colonia. Su producción depende de las características del cultivo (medio, temperatura, iluminación, tiempo y agitación) y en la medida que envejece y dependiendo del medio de cultivo, puede obtenerse un color amarillo intenso, hasta llegar a las tonalidades ocre.

En la observación microscópica, se destacaron las hifas delgadas, formadas a partir de hifas postradas, sencillas o en nudos de 2 ó 3. Conidios en cadena, subglobosos a lagrimosos. No se observan diferencias en las características morfológicas de la cepa en los diferentes medios de cultivos estudiados, coincidiendo sus características con las descritas por Hidalgo-Díaz (2) para esta variedad.

**Caracterización Enzimática:** Como parte de la caracterización, se condujeron diversos ensayos bioquímicos de dinámica para el estudio de la inducción de diferentes enzimas, en distintos medios de cultivo (13).



**Figura 6.** Crecimiento de la cepa IMI SD 187 (disco 5mm, 21 días a 25°C) Izquierda: en Agar Papa Dextrosa. Derecha: en Agar Extracto de Malta. / Growth of the strain IMI SD 187 (5mm disc, 21 days at 25°C) Left: on Potato Dextrose Agar. Right: on Malt Extract Agar



**Figura 7.** Crecimiento de la cepa IMI SD 187. Izquierda: en Agar Harina de Maíz (disco 3mm, 21 días a 25°C). Derecha: en Medio semiselectivo (21 días a 25°C). / Growth of the strain IMI SD 187. Left: on Corn Meal Agar (3mm disc, 21 days at 25°C). Right: on semi-selective medium (21 days at 25°C).



**Figura 8.** Crecimiento de la cepa IMI SD 187 en AP-50. Izquierda: Disco 5 mm, 21 días a 25°C. Derecha: Tubo de 7 días a 25°C. / Growth of the strain IMI SD 187 on AP-50. Left: 5 mm disc, 21 days at 25°C. Right: Seven day tube at 25°C.

### Inducción de proteasas en medio sólido

La cepa se mantuvo durante toda la dinámica (3, 5 y 7 días) mostrando una respuesta más rápida (producción de proteasas) que el resto de las cepas analizadas, ante la inducción con gelatina. En todos los tiempos analizados, se alcanzaron altos valores de crecimiento de la colonia, que se compensaron con altos valores de producción de halo de degradación, de ahí que siempre mostró valores significativamente diferentes y mayores, hasta el séptimo día (14, 15).

### Inducción de proteínas en medio líquido

Con relación a la inducción de proteínas totales en medio líquido basal, los niveles alcanzados por la cepa de *catenulata*, se mantuvieron en valores intermedios, mostrándose en el séptimo día valores significativamente diferentes e inferiores, en comparación con el resto de las cepas. También, mostró un comportamiento similar en el medio suplementado con gelatina. En medio suplementado con quitina, la cepa IMI SD 187 evidenció mayor síntesis de proteínas, agrupándose con las cepas 399 y 10, de las cuales no difirió significativamente. El medio con lípidos fue, igualmente, un buen inductor de proteínas totales, aunque la cepa IMI SD 187 produjo los valores más bajos, sin diferencias significativas respecto a los niveles mostrados por otras cepas. En todos los medios estudiados para la cepa IMI SD 187, se pudo observar un máximo de producción de proteínas totales los 5 días (16).

Las enzimas con actividad proteolítica, no tuvieron un comportamiento significativo en medio basal para la cepa IMI SD 187. Sin embargo, en los medios suplementados con gelatina, quitina y lípidos, sí se manifestó de forma general un comportamiento similar a otras cepas con niveles elevados de síntesis de proteasas. Sobresalió el hecho, de que las exoquitinasas no se indujeron fácilmente en los medios analizados, de manera general, y tampoco para esta cepa. Las esterasas, por su parte, solo mostraron valores medibles en los medios basales y gelatina. En este último, la cepa IMI SD 187, se destacó con valores estadísticamente superiores de actividad y con una respuesta más sostenida en el tiempo (16).

Los niveles de producción de la enzima VCP1 (relacionada con la patogenicidad en cepas de la variedad *chlamydosporia*) resultaron inexplicablemente bajos para la cepa IMI SD 187 y en cualquiera de los medios utilizados para inducir su producción, aspecto que posteriormente se analizó a través de otras técnicas, tomando como diana el ADN.

### Efecto del potencial matricial y osmótico sobre el crecimiento radial de *Pochonia*

El efecto de variar el potencial matricial y osmótico sobre el crecimiento radial de *Pochonia*

*chlamydosporia* y la acumulación de polioles, se estudió en tres aislados de este hongo (uno de los aislados estudiados fue la cepa IMI SD 187). El crecimiento radial se midió en medio papa dextrosa agar modificado osmóticamente con KCl o glicerol; mientras, el PEG 8000, se utilizó para modificar el potencial matricial. Se analizaron cuatro polioles (glicerol, eritritol, arabitol y manitol) y un azúcar (glucosa). Los resultados mostraron que el crecimiento radial disminuyó con el incremento del estrés osmótico o matricial. Aunque, se detectaron diferencias significativas en el comportamiento frente al estrés matricial de los aislados analizados, no existieron diferencias frente al estrés osmótico. De igual forma, se encontraron diferencias entre los aislados, en cuanto a los niveles de polioles acumulados en respuesta al estrés matricial, no así, frente al osmótico; aunque en este caso los aislados acumularon diferentes combinaciones de los polioles, en dependencia del agente utilizado para crear el estrés. El arabitol y el glicerol fueron los principales polioles acumulados en medio de cultivo osmóticamente modificado; mientras que el eritritol lo fue en el medio modificado con PEG 8000. El arabitol y el glicerol fueron los principales polioles acumulados en un medio modificado osmóticamente (KCl o glicerol), mientras que el eritritol fue el principal poliol acumulado en medio modificado con PEG. Los autores plantearon que *Pochonia chlamydosporia* pudiera utilizar diferentes mecanismos de osmoregulación para evitar los estreses osmótico y matricial (17).

### Estudio de los contenidos de proteínas de las esporas

Por otra parte, se determinó el contenido de proteínas totales de las esporas de un grupo de cepas. Se observó que las esporas con un contenido mayor de proteínas totales fueron las procedentes de la cepa 10, seguidas de las de la cepa IMI SD187. De este resultado se puede inferir que las esporas de ambas cepas (IMI SD 187 y 10) pudieran sobrevivir mejor en el suelo, donde las condiciones son más adversas y existe la competencia por un nicho común con otros microorganismos (datos no mostrados).

### Detección de VCP1 en la cepa por RFLP y PCR con cebadores específicos para esta enzima

No se detectó el gen codificador para la enzima VCP 1 por la técnica de RFLP en la cepa IMI SD 187, aun cuando las condiciones de astringencia se redujeron al mínimo posible. De manera similar, también fueron negativos los resultados en todas las parejas de cebadores específicos empleadas para la amplificación de la VCP1 mediante PCR, para esta cepa. Ante estos resultados negativos, se indicó

que la proteasa VCP1 en esta cepa era muy diferente a la encontrada en el resto de las cepas de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*, estudiados con anterioridad por otros autores (18, 19, 20) o, simplemente, no se producía (21).

Posteriormente, se realizaron otros ensayos que confirmaron los hallazgos antes mencionados. El análisis de las secuencias de ADN de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* de la cepa IMI SD187, específicamente, la secuencia del gen que codifica para la VCP1 (EU266590) indicó que el sitio activo era similar al de otros aislados procedentes de nematodos formadores de agallas, en lugar de aislados de nematodos del quiste, con ácido glutámico en la posición 171 y glicina en la posición 208 en la proteína. Sin embargo, hubo 71 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) y 19 diferencias de aminoácidos en comparación con *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* aislado 10 (AJ427460) en contraste con los 15 SNP, y las diferencias de 4 aminoácidos observados, al compararse las secuencias de VCP1 de seis aislados de *P. chlamydosporia* var. *clamydosporia*. Las regiones ITS 1 y 2 de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* 392 IMI SDF 187), EU266591, mostraron una identidad casi completa con otras secuencias ITS de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* en la base de datos GenBank en NCBI (AJ292398; AJ392399) difiriendo solamente en una base en ITS 2. La secuencia del gen 5.8S (situado entre ITS 1 e ITS 2) resultó casi idéntica a la de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* cepa CBS 504.66 (AJ292398) que a IMI 331575 (AJ292399) la única secuencia ITS de otra cepa de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* en GenBank en el momento de escribirse el artículo referido en este trabajo. Además, hubo diferencias de 18 nucleótidos cuando las regiones ITS y 5.8S de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* 392 se compararon con la región correspondiente de *P. chlamydosporia* var. *clamydosporia* aislado 10 (AJ291800) (22).

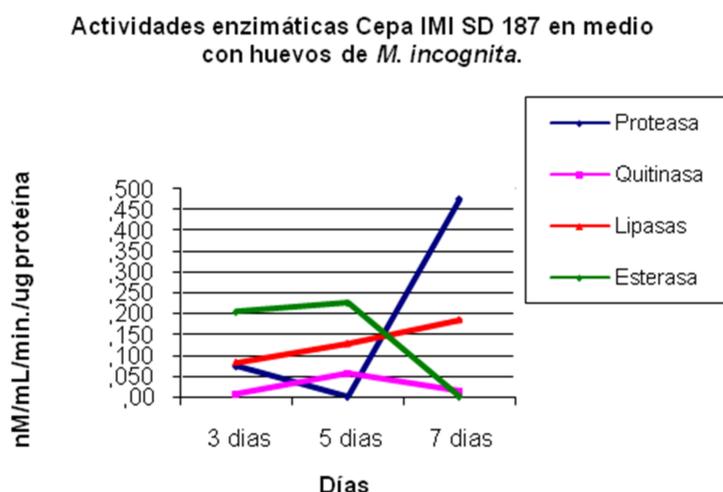
## Inducción de enzimas extracelulares con huevos de *Meloidogyne incognita* y de *Globodera pallida* como agentes inductores

La cepa IMI SD 187 sobresalió, respecto a las otras cepas, por poseer altos niveles de esterases y proteínas totales, en el medio basal y suplementado con huevos de *M. incognita*. Al analizar la cepa en el medio inoculado con huevos de su hospedante originario, se observó una relación entre el comportamiento de las enzimas estudiadas y los pasos del mecanismo de infección de los huevos por el ACB (Fig. 9)(23).

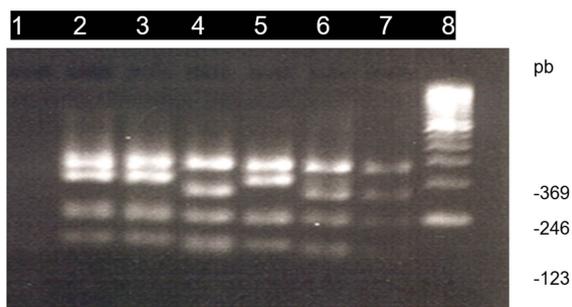
Además, se mostró que la cepa autóctona de Cuba fue capaz de infectar huevos de *G. pallida*, por lo cual puede ser utilizada también en el control de este nematodo, teniendo como base una caracterización del comportamiento enzimático de esta cepa en presencia de los dos hospedantes estudiados (23).

## Caracterización Molecular

Se desarrollaron ensayos para la extracción de ADN a partir de muestras de suelo, con el objetivo de incrementar la eficacia de los métodos de diagnóstico basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés: Polymerase Chain Reaction), así como protocolos basados en la amplificación de los ITS y su corte con enzimas de restricción para la identificación y diferenciación rápida y certera de las dos variedades de *P. chlamydosporia* (24). Los cortes del fragmento amplificado con la enzima *HinF1* generaron en la variedad *chlamydosporia*, bandas del tamaño de 270, 220, 90 y 50 pb (Línea 2) y en la var. *catenulata* de 270, 180, 90 y 50 pb (Líneas 4, 6 y 7). Las cepas de la var. *catenulata* biotipo A (Líneas 3 y 5) generaron bandas similares a las generadas por la var. *chlamydosporia* (Fig. 10)(25).



**Figura 9.** Dinámica de la inducción de enzimas relacionadas con el proceso de infección en medio suplementado con huevos de *M. incognita* para la cepa. / Dynamics of the induction of enzymes related to the infection process on a medium supplemented with *M. incognita* eggs for the strain.



**Figura 10.** Análisis por RFLP de la secuencia ITS digerida con la enzima *HinF1* de aislamientos de *Pochonia chlamydosporia*. Línea 1: Control negativo, Línea 2 var. *chlamydosporia* (338); Línea 3: var. *catenulata* biotipo A (370); Línea 4: var. *catenulata* (392); Línea 5: var. *catenulata* biotipo A (374); Línea 6: var. *catenulata* (353); Línea 7: var. *catenulata* (108); Línea 8: marcador de 100 pb. / RFLP analysis of the ITS sequence digested with the *HinF1* enzyme of *Pochonia chlamydosporia* isolates. Lane 1: Negative control, Lane 2 var. *chlamydosporia* (338); Lane 3: var. *catenulata* biotype A (370); Lane 4: var. *catenulata* (392); Lane 5: var. *catenulata* biotype A (374); Lane 6: var. *catenulata* (353); Lane 7: var. *catenulata* (108); Lane 8: 100 bp marker.

El análisis de RFLP del producto PCR-ITS logró distinguir a los aislamientos de *P. chlamydosporia* var. *catenulata*, de aislamientos del biotipo A de la misma variedad y de la var. *chlamydosporia* (25).

### Desarrollo de cebadores específicos para *catenulata*

La identificación inequívoca entre las dos variedades *chlamydosporia* y *catenulata*, se logró a través una pareja de cebadores específicos, generando un producto simple de PCR de aproximadamente 352 pb (22). El cebador desarrollado solo detectó los productos generados a partir del ADN extraído de los aislados de *P. chlamydosporia* var. *catenulata*, y no fue generada banda a partir de ningún otro hongo de las 21 muestras que se analizaron (Tabla 1).

A pesar de los avances alcanzados en la caracterización de la cepa seleccionada, aún no se lograba diferenciar entre el aislamiento seleccionado y aislamientos de la misma variedad, estrechamente relacionados por su origen. Por consiguiente, Arévalo (11) se propuso profundizar en la diversidad molecular de *P. chlamydosporia* con el uso de PCR-RAPD (del inglés Random Amplified Polymorphic DNA: Polimorfismo del ADN amplificado al azar) y 19 cebadores aleatorios. El estudio se realizó sobre 16 cepas de *P. chlamydosporia*, obtenidas de colecciones de referencia de diferentes regiones del mundo.

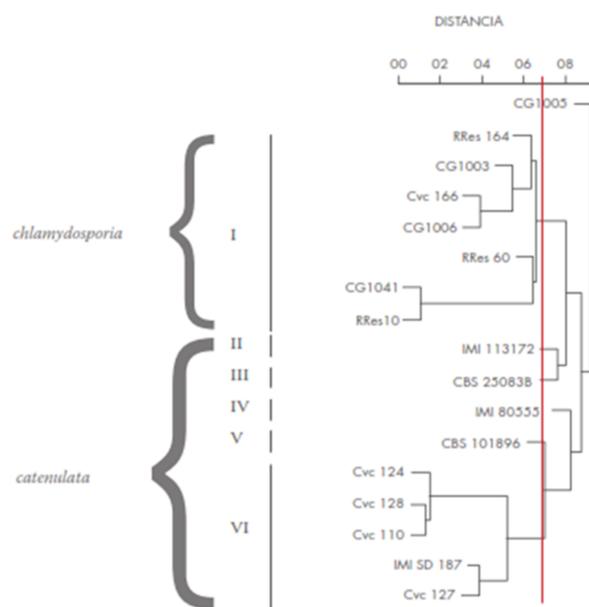
Se detectó un polimorfismo con niveles de variabilidad entre 0,7 y 14,2 % , entre las cepas de *P. chlamydosporia* evaluadas. A partir de una distancia de 0,65; se formaron seis agrupaciones, dos de ellas se distribuyeron en la mayoría de los aislados en estudio

**Tabla 1.** Análisis de PCR usando los cebadores específicos para la detección de *chlamydosporia* y *catenulata*, y de RFLP de los productos PCR-ITS usando *HinF1* (25). / PCR analysis using the specific primers for the detection of *chlamydosporia* and *catenulata*, and RFLP analysis of the PCR-ITS products using *HinF1* (25).

Código (Rothamsted, UK)	Origen	<i>P. chlamydosporia</i> var.	Probado con el cebador var. <i>chlamydosporia</i>	Probado con el cebador var. <i>catenulata</i>	Grupo ITS digerido con <i>HinF1</i>
327	Cuba	<i>chlamydosporia</i>	+	-	B
338	Cuba	<i>chlamydosporia</i>	+	-	B
363	Cuba	<i>chlamydosporia</i>	+	-	B
368	Cuba	<i>chlamydosporia</i>	+	-	B
372	Cuba	<i>chlamydosporia</i>	+	-	B
373	Cuba	<i>chlamydosporia</i>	+	-	B
378	Cuba	<i>chlamydosporia</i>	+	-	B
387	Cuba	<i>chlamydosporia</i>	+	-	B
207	Italia	<i>chlamydosporia</i>	+	-	B
204	Italia	<i>chlamydosporia</i>	+	-	B
10	Brasil	<i>chlamydosporia</i>	+	-	B
336	Cuba	<i>catenulata</i>	-	+	A
341	Cuba	<i>catenulata</i>	-	+	A
353	Cuba	<i>catenulata</i>	-	+	A
391	Cuba	<i>catenulata</i>	-	+	A
IMI 187	Cuba	<i>catenulata</i>	-	+	A
364	Cuba	<i>catenulata</i> Biotipo A	-	-	B
366	Cuba	<i>catenulata</i> Biotipo A	-	-	B
370	Cuba	<i>catenulata</i> Biotipo A	-	-	B
374	Cuba	<i>catenulata</i> Biotipo A	-	-	B
382	Cuba	<i>catenulata</i> Biotipo A	-	-	B

Leyenda: A y B tamaño de banda generadas (A) 270, 180, 90, 50 pb (B) 270, 220, 90, 50 pb

(Fig. 11). Las cepas más próximas a la seleccionada (IMI SD187) fueron, precisamente, las de la var. *catenulata* originarias de Cuba. La cepa Cvc127, originaria de la provincia de Guantánamo, fue la de mayor similitud con el 60 %, aproximadamente.



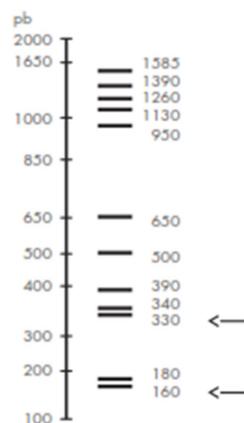
**Figura 11.** Dendrograma que representa el agrupamiento entre las cepas de *Pochonia chlamydosporia* generados por el análisis de UPGMA. / Dendrogram representing the clustering between *Pochonia chlamydosporia* strains generated by the UPGMA analysis.

Cuatro de los cebadores RAPD evaluados (A04, M10, M20 y K01) permitieron la obtención de fragmentos específicos para la cepa IMISD 187. De ellos, el K01 evidenció una mayor separación de esta cepa entre otras, estrechamente relacionadas con un índice de similitud de 0,45 respecto a la cepa más cercana (Cvc 127). En la Figura 12 se muestra, de manera esquemática, el tamaño de los fragmentos del perfil generado por la amplificación con este marcador para la cepa. Las bandas de 330 y 160 pb fueron específicas de la cepa IMI SD187. Por esta razón, se considera que estas podrían ser útiles para el diseño de marcadores de secuencia caracterizada (SCAR) (11).

De esta forma, se confirmó la singularidad de la cepa seleccionada en Cuba, y se justifica el desarrollo de una tecnología para su producción masiva y la obtención de un producto microbiano para el manejo de nematodos formadores de agallas del género *Meloidogyne*.

#### Estandarización de la PCR en Tiempo Real para el monitoreo de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* en muestras de suelo

En un experimento de parcelas, después de aplicada la cepa IMI SD 187, se constató que solo esta cepa se encontraba en las muestras de suelo analizadas.

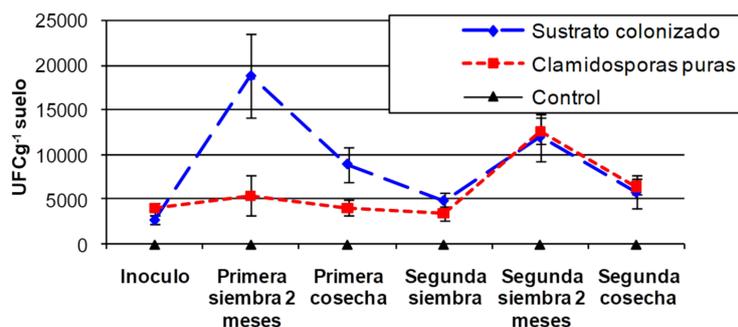


**Figura 12.** Perfil esquemático del patrón de polimorfismo para la cepa IMI SD187 con el cebador K01 (OPERON TECHNOLOGY). Las flechas indican las bandas específicas. / Schematic profile of the polymorphism pattern for the strain IMI SD187 with the primer K01 (OPERON TECHNOLOGY). Arrows indicate specific bands.

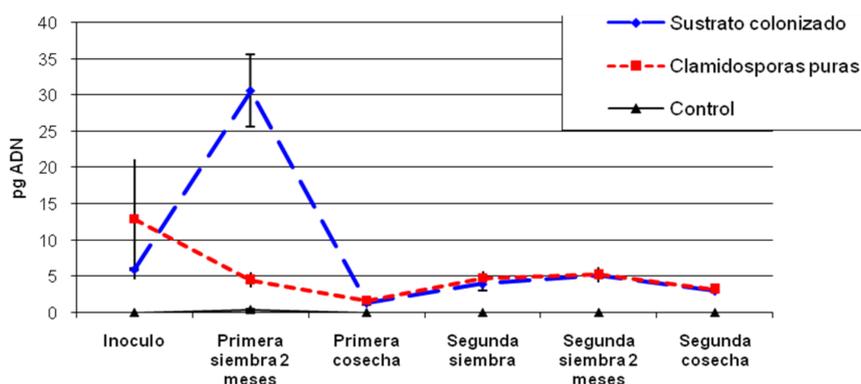
Se utilizaron los cebadores CATrF y CATrR, los cuales, por amplificación, generaron un producto PCR de 97 pb, a partir del ADN de todas las cepas de *P. chlamydosporia* var. *catenulata*. La curva estándar para *P. chlamydosporia* var. *catenulata* generada, tuvo un coeficiente de correlación lineal de  $r^2 = 0.9979$ , demostrando la precisión de la cuantificación basada en la PCR. Aplicando este método, fue posible detectar concentraciones de ADN de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* de hasta 100 fg (26).

Los resultados de la siembra de las muestras de suelo en placas de medio semi - selectivo, así como los de la PCR en Tiempo Real, demostraron un incremento en abundancia del hongo, después de su aplicación como sustrato colonizado (Fig. 13 y 14). Este incremento fue significativo en las muestras tomadas, después de dos meses y en la primera cosecha (F.pr 0,03 ( 5,160 y 0,013 ( 2,152, respectivamente)) para el conteo de las UFC/g en medio semi - selectivo a partir de suelo tomado de los tratamientos con sustrato colonizado, en comparación con aquellos tratados con clamidosporas puras. Significativamente, más ADN del hongo, se detectó por la PCR en Tiempo Real en suelo tomado del tratamiento con clamidosporas puras, en comparación con el de sustrato colonizado en el momento de la inoculación (F.pr 0,012 ( 1,761) pero, después de dos meses, se detectó más ADN del hongo en el suelo tratado con sustrato colonizado (F.pr 0,001 (1,91) (26).

Los datos de UFC/g indicaron que la cantidad de ADN del hongo aumentó después de la primera cosecha. Posteriormente, esta retornó a las cantidades de 2 a 4 pg, las cuales pudieran representar el nivel umbral de la densidad del hongo, que el suelo es capaz de mantener (26).



**Figura 13.** Niveles de UFC g<sup>-1</sup> de suelo de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* detectados por siembra en medio semi-selectivo, durante la dinámica para los tratamientos con el hongo y el control. / Soil CFU g<sup>-1</sup> levels of *P. chlamydosporia* var. *catenulata* detected by culturing.



**Figura 14.** Niveles de ADN de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* detectados por la PCR en Tiempo Real, durante la dinámica para los tratamientos con el hongo y el control. / DNA levels of *P. chlamydosporia* var. *catenulata* detected by Real-Time PCR during the dynamics for the treatments with the fungus and the control.

### CAPÍTULO III: ESTUDIOS DE SEGURIDAD DE LA CEPA IMI SD 187 DE *POCHONIA CHLAMYDOSPORIA* VAR. *CATENULATA*

Para demostrar la seguridad de la cepa, se realizaron estudios de toxicidad-infectividad-patogenicidad de nivel I en mamíferos, aves, invertebrados benéficos y plantas terrestres, basados en el análisis de los efectos tóxicos, las muertes y la capacidad de provocar infectividad y/o patogenicidad. Los métodos que se utilizaron siguieron las pautas y criterios establecidos por los organismos regulatorios nacionales e internacionales (27, 28, 29).

En los estudios con vertebrados: ratas, conejos y aves, no se detectó toxicidad ni infectividad (30, 31). Los estudios de irritación dérmica y ocular, en conejo, clasificaron al hongo, como no irritante para la piel y los ojos (32). Sin embargo, en el estudio de sensibilización, el 30 % de los animales tratados (curieles albinos Harley) presentaron dermatitis alérgica por contacto; por tanto, el hongo se clasifica como potencial alergénico. Para el caso de la evaluación en invertebrados no-diana, el hongo resultó no tóxico para lombriz de tierra (*Eisenia andrei* B.), abeja (*Apis mellifera* L.) y crisopa (*Chrysopa exterior* N.), tampoco produjo fitotoxicidad en los cultivos de maíz (*Zea mays* L.) y frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) (33, 34).

A partir de estos resultados, la cepa IMI SD187 de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* se clasificó, como no tóxica, ni patógena, ni infecciosa, ni irritante para mamíferos. De igual manera, se evidenció que no produce efectos ecológicos adversos, de acuerdo con las pruebas reguladas para este fin. Todo ello avala su mínimo riesgo para la salud animal, humana y el ecosistema.

### CAPÍTULO IV: GUÍA DE BUENAS PRÁCTICAS DE FABRICACIÓN DEL BIONEMATICIDA

#### Sistema de manejo y protección de los bancos de la cepa IMI SD 187

La cepa IMI SD 187 quedó depositada en la Colección de Recursos Genéticos del CABI con el código IMI SD 187, teniendo acceso autorizado solamente el depositador. También, se encuentra conservada y protegida en la colección de hongos nematófagos de Rothamsted (Reino Unido) y en la del CENSA. La autenticidad de la cepa se estableció durante todo el proceso de depósito, utilizando los tres niveles de identificación descritos anteriormente.

#### Obtención de los bancos de trabajo de la cepa

Sobre la base del sistema de control de la calidad establecido en el CENSA, y teniendo en cuenta

las particularidades del proceso de conservación y producción de un agente de control biológico, se comenzó el trabajo referente a la calidad y sus indicadores en estos procesos (35, 36). Los Bancos obtenidos se lograron sin contaminantes ni antes ni después de la liofilización, cumpliendo con la exigencia de pureza para este material. La confirmación de la identidad, utilizando el cebador específico para la var. *catenulata* mostró una sola banda de 352 pb. Los mismos, se duplicaron, conservándolos en un refrigerador de la Unidad de Investigación Desarrollo de Controles Biológicos y bajo la salvaguarda de la colección de cepas del CENSA, como una garantía de que, ante cualquier desastre, se asegure la viabilidad de la misma.

El establecimiento del cepario de producción (banco primario de la cepa y banco de trabajo o de producción) permite que siempre se parta del mismo material, nivel de pase y condiciones de mantenimiento y conservación. Estos resultados se integran junto a la caracterización cultural y morfológica, como una herramienta para el control de la calidad de los bancos de la cepa IMI SD 187.

A partir de todos estos resultados, se demostró que la cepa IMI SD 187 de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* cuenta con su sistema de identificación, conservación y manejo, los cuales forman parte de las especificaciones de calidad y el logro de la consistencia productiva, como primer elemento en la fabricación de un bioplaguicida microbiano (37).

#### Estabilidad de la cepa MI SD 187:

##### Estabilidad a partir de una colonia

Los resultados no expresaron diferencias para ninguno de los parámetros evaluados (crecimiento micelial radial, la producción y viabilidad o porcentaje de germinación de las clamidosporas, así como el parasitismo de huevos) de los subcultivos, comparados con la cepa original (37, 38). (Fig. 15)

Los resultados demostraron que la cepa es estable, cuando se conserva en tubos con medio PA-50 a 4°C, hasta el período y número de pases estudiados, al ser comparadas con las características de la cepa original (35).

##### Estabilidad a partir de la actividad enzimática

Todos los subcultivos mostraron el mismo comportamiento e intensidad de color para las

enzimas probadas. Las enzimas más importantes parecen ser dos tipos diferentes de esterases, con aproximadamente de 20 a 30 nanomoles/g, las fosfohidrolasas con concentraciones aproximadas de 10 a 20 a nanomoles/g y las quitinasas con niveles de 5 nanomoles/g (Fig. 16). No existieron diferencias en cuanto a la actividad enzimática de los diferentes subcultivos evaluados (37).

#### Estudio del efecto de los subcultivos sucesivos de la cepa en la producción de enzimas extracelulares

##### Inducción de proteasas en medio sólido en subcultivos del aislamiento

El análisis de la actividad proteasa (AP) no mostró diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los días analizados ni para los subcultivos estudiados en medio sólido (Fig. 17) (15)

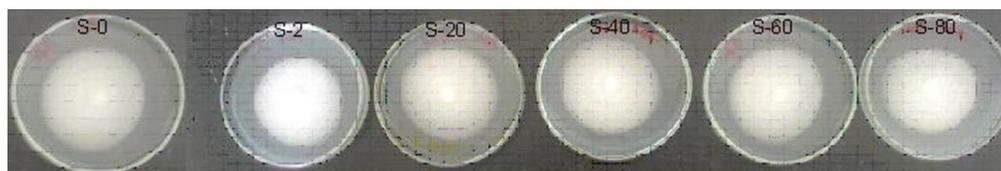
##### Inducción de proteínas en medio basal líquido o medios suplementados

En cada uno de los medios líquidos ensayados (Medio basal, suplementado con gelatina, suplementado con quitina y suplementado con lípidos) se observó, como tendencia general, la similitud en el comportamiento de los subcultivos. Solo es excepcional el valor significativamente mayor para el subcultivo 2, en el medio suplementado con quitina a los 7 días. En todos los medios estudiados, se produjo, a los 5 días, un máximo de la síntesis de proteínas totales. Para este indicador, el medio suplementado con lípidos fue el mejor (16).

Para los análisis de las actividades enzimáticas los resultados fueron similares. No obstante, se observó que el medio suplementado con gelatina fue un buen inductor, ya que en la mayoría de los indicadores analizados y en los tiempos estudiados de la dinámica en este medio, se obtuvieron niveles de inducción importantes. El medio suplementado con lípidos fue un mal inductor, especialmente para las esterases, a pesar de que se conoce que la cepa, en particular, es una buena productora de este tipo de enzimas (16).

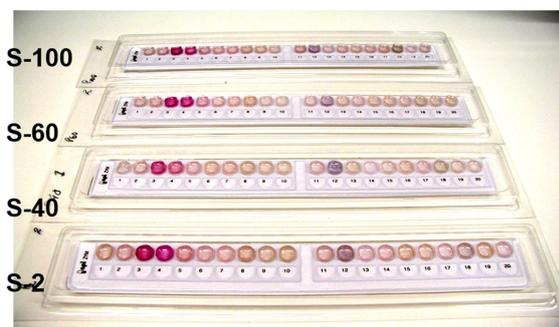
##### Estabilidad a partir de la producción masiva de la cepa

El análisis estadístico no mostró diferencias significativas en ninguno de los parámetros evaluados (Fig. 18) lo que demuestra que no existe variabilidad

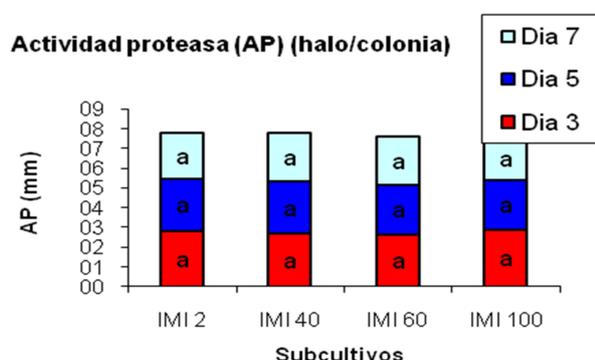


**Figura 15.** Crecimiento de las colonias de cada subcultivo comparada con la cepa original en el medio PA-50 después de 21 días de incubación a 25°C. Leyenda: S: Subcultivo. / Colony growth of each subculture compared to the original strain on PA-50 medium after 21 days of incubation at 25°C. Legend: S: Subculture

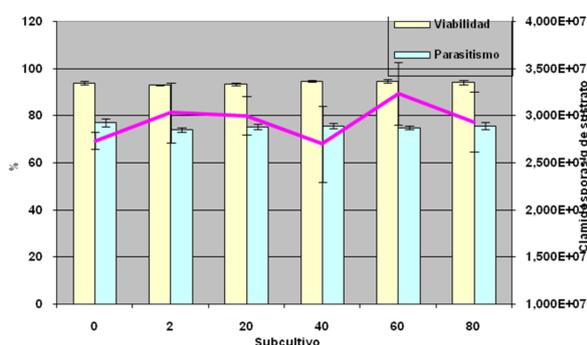
sobre las características productivas y de actividad biológica de la cepa MI SD 187 cuando se somete a procesos de fermentación sólida (38).



**Figura 16.** Efecto sobre la actividad enzimática de diferentes subcultivos de la cepa IMI SD 187. / Effect of different subcultures of the strain IMI SD 187 on the enzymatic activity.



**Figura 17.** Actividad Proteasa (AP) a los 3, 5 y 7 días post inoculación de los subcultivos de la cepa de *P. chlamydosporia* var. *catenulata*. Medias con letras desiguales, difieren significativamente para la Prueba de Rangos Múltiples de Duncan ( $p \leq 0,05$ ). DS = 0.085. / Protease activity (AP) of the subcultures of the *P. chlamydosporia* var. *catenulata* at 3, 5 and 7 days post inoculation. Means with no common letters differ significantly for Duncan's Multiple Range Test ( $p \leq 0.05$ ). SD = 0.085.



**Figura 18.** Efecto sobre las características productivas y patógenicas de los productos de la producción masiva obtenidos de diferentes subcultivos de la cepa MI SD 187 a nivel *in vitro*. / Effect on the productive and pathogenic characteristics of mass production products obtained from different subcultures of the strain MI SD 187 at an *in vitro* level.

Los valores de producción de clamidosporas se mantuvieron por encima de  $1 \times 10^7$  clamidosporas/g de sustrato, aún en el subcultivo 80, demostrándose que este indicador no sufre variabilidad. El porcentaje de parasitismo se mantuvo por encima del 73 %. El inóculo exhibió los mayores valores con un 77 %. En este estudio, se confirmó que la Fermentación en Estado Sólido (FES) permite obtener productos con una alta actividad biológica. A partir de los subcultivos conservados a 4°C, se obtienen productos con las mismas características, evidenciándose que este método de conservación y los procesos de reproducción no afectan la producción de clamidosporas ni su efectividad (38).

### Estabilidad a partir de un experimento controlado en maceta

No existieron diferencias en la actividad colonizadora y patogénica de la cepa. Fue capaz de colonizar masas de huevos y parasitar huevos de *M. incognita*, con valores por encima del 80 %. La colonización de masas alcanzó valores del 98 %. En todos los casos, los valores del parasitismo de huevos, se mantuvieron por encima del 70 %, indicadores muy similares a los obtenidos por la cepa original (68 %) en los estudios de Hidalgo-Díaz (2).

La cepa se reprodujo mediante la aplicación de una novedosa tecnología de fermentación en estado sólido, en bolsas con filtro. Esta tecnología se implementó en la Unidad de Desarrollo de Hongos Biocontroleros del CENSA, a través de una Guía de Buenas Prácticas de Fabricación (BPF) que permitió definir los requisitos específicos para la obtención del bionemático a base de la cepa IMI SD187 (39).

En el periodo comprendido de 2003-2007, se produjeron 98 lotes a escala piloto (25 kg cada uno). Los indicadores de calidad del producto final (Tabla 2) se mantuvieron dentro de los rangos establecidos con un comportamiento promedio de:  $1,6 \times 10^7$  clamidosporas.g<sup>-1</sup> de sustrato, 91,32 % de viabilidad de las clamidosporas, 77,04 % de parasitismo de huevos de *M. incognita*, 5,43 % de contenido de agua y una concentración de microorganismos contaminantes de  $8,1 \times 10^4$  UFC.g<sup>-1</sup> de producto (40).

Los resultados de los estudios de caracterización y estabilidad de la cepa, conjuntamente con los de seguridad y la tecnología de producción masiva bajo el cumplimiento de las BPF, avalaron el otorgamiento del permiso de seguridad biológica para la producción e investigación con la cepa IMI SD187 de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* (Permiso No. HB05-P (14) 09) y de liberación en suelos agrícolas del país como bionemático (Permiso No. HB05-P (45) 08). La consistencia del producto se demostró mediante la producción de 150 lotes a escala piloto, en un periodo de siete años. El producto

**Tabla 2.** Especificaciones de calidad del producto. / Quality specifications of the product.

Requisitos de calidad	Método de ensayo	Criterio de aceptación
Características organolépticas	Observación visual	Bolsa de polipropileno que contiene un granulado de color ocre
Masa promedio	USP XXIII, 1995	500 g o 1 Kg $\pm$ 10 %
Identidad	Viabilidad y conteo de clamidosporas	Conidios en cadena y presencia de clamidosporas
Concentración del principio activo	Conteo de clamidosporas en cámara de Neubauer.	$\geq 10^7$ clamidosporas.g <sup>-1</sup> de sustrato
Actividad biológica	Viabilidad y parasitismo	$\geq 85$ % de viabilidad de las clamidosporas $\geq 70$ % de parasitismo de huevos de <i>M. incognita</i> cada 4 lotes
Contaminación microbiana	Límite microbiano. USP XXV, 2002	Menor de 10 <sup>5</sup> UFC.g <sup>-1</sup> de producto. No presencia de bacterias, ni hongos patógenos
Contenido de agua	USP XXV, 2002 o Balanza infrarroja	Menor o igual de 5 %
Hermeticidad	FEUM, 1998	Bolsas de polipropileno herméticas

alcanza un promedio de 91,38 % de viabilidad de las clamidosporas, una concentración de 1,6 x 10<sup>7</sup> clamidosporas.g<sup>-1</sup> de producto y un 77 % de parasitismo en huevos (41).

De esta forma, se contó con los requisitos necesarios para iniciar los ensayos de validación de la efectividad del producto microbiano a base de la cepa seleccionada IMI SD187 en la reducción de las poblaciones de nematodos, en condiciones de producción. Este es el último paso exigido por los órganos reguladores en el proceso de registro de un ACB.

Finalmente, se realizaron estudios encaminados a la evaluación de diferentes formulaciones. En total, se evaluaron ocho formulaciones elaboradas, según combinación de polvo puro del hongo nematófago *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* IMI SD 187, uso de zeolita como relleno (50 %, 80 %, 90 %) y sellaje (ausencia o presencia de aire atmosférico) y se modificaron las condiciones de almacenamiento (4°C o 25°C) para un total de 16 tratamientos. En cada tratamiento se midió el porcentaje de humedad y la concentración de hongo viable (UFC.g<sup>-1</sup>). Finalmente y por medio de la metodología de superficie respuesta, se obtuvo la combinación de porcentaje de relleno de zeolita y temperatura de almacenamiento que favoreció la germinación.

En todos los tratamientos el porcentaje de humedad permaneció por debajo del 10 %, pero solo en seis tratamientos la concentración de hongo viable se mantuvo estable. El oxígeno y nitrógeno del aire no modificaron, de manera significativa, los resultados. Se localizó un punto de máxima germinación de clamidosporas con el uso de 30 a 40 % de zeolita como relleno, almacenando el producto a 15°C. Se propuso un diseño compuesto central 10+2x2+2 para validar el proceso (42).

## CAPÍTULO V: APLICACIÓN Y USO EN CAMPO DE LA CEPA IMI SD 187 DE *POCHONIA* *CHLAMYDOSPORIA* VAR. *CATENULATA* PARA EL CONTROL DE *M. INCOGNITA*

### Establecimiento de criterios básicos para la aplicación de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* como agente de control biológico de *Meloidogyne incognita* en cultivos hortícolas

Desde el año 2004, ya se conocía del potencial del aislado IMI SD 187 como agente de control biológico frente a esta plaga, en cultivos de hortalizas. El hongo redujo, de manera significativa, las infestaciones de nematodos cuando se aplicó en combinación con plantas pobres hospedantes del nematodo, en un sistema de rotación de cultivos (43). De ahí partieron una serie de investigaciones que condujeron al establecimiento de criterios básicos para su aplicación en campo.

### Determinación de la concentración de inóculo mínima efectiva de la cepa IMI SD 187 de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* para el control de *M. incognita*

Al evaluar diferentes concentraciones de inóculo de *P. chlamydosporia* var. *catenulata*, la curva de regresión lineal indicó que, con el aumento de las mismas, ocurre un incremento constante de las UFC del hongo en suelo y raíces del cultivo de tomate, lo que demostró su alto poder de colonización (44).

La actividad parasítica de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* tuvo un incremento acelerado hasta que se alcanzaron niveles de colonización del hongo de 8 x 10<sup>4</sup> UFC por g de suelo y 8 x 10<sup>3</sup> UFC por g de raíz, correspondientes con una concentración de inóculo inicial de 5 000 clamidosporas. A partir de

estos puntos, tiende a estabilizarse la colonización de masas de huevos y el parasitismo de huevos en rangos aproximados, de 90-100 % y de 85-95 %, respectivamente; lo que indica que concentraciones de inóculo más altas, aunque proporcionan una mayor colonización por el hongo, no favorecen un incremento notable sobre la actividad parasítica (44).

Entre los valores de colonización de sustrato y raíces correspondientes a concentraciones entre 1 000 y 5 000 clamidosporas por g de sustrato, ocurrió un incremento rápido de la colonización de masas de huevos y parasitismo de huevos de *M. incognita* por *P. chlamydosporia* var. *catenulata*. Con concentraciones de inóculo de 2 000 clamidosporas por g de sustrato, se lograron valores de parasitismo de huevos de alrededor de un 60 % con diferencias significativas, respecto al resto. Entre las concentraciones de 3 000 a 5 000 clamidosporas por g de sustrato, no se presentaron diferencias significativas en cuanto a la colonización de masas de huevos y parasitismo de huevos, en las que se alcanzaron valores superiores al 80 % y al 75 %, respectivamente (Tabla 3) (44).

Los resultados obtenidos demostraron que las concentraciones de inóculo mínimas efectivas para el control de *M. incognita* por la cepa IMI SD 187 de *P. chlamydosporia* var. *catenulata*, se encuentran entre 3 000 y 5 000 clamidosporas por g de sustrato. No obstante, se recomienda la aplicación del valor superior dentro de este rango, 5 000 clamidosporas por gramo de sustrato, en los posteriores ensayos, ya que en condiciones de campo existen múltiples factores que pueden influir de manera negativa sobre el hongo (44).

#### Efecto de dos momentos de aplicación de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* sobre su eficacia en el control de *M. incognita*

La colonización del sustrato y raíces del cultivo del tomate, así como la capacidad parasítica de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* sobre *M. incognita*

fueron superiores con la aplicación del mismo incorporado al sustrato en el momento del transplante, con diferencias muy significativas, respecto a la incorporación en el sustrato del cepellón. No obstante, la aplicación al sustrato del cepellón permitió que los niveles de colonización de las raíces del cultivo del tomate alcanzada por *P. chlamydosporia* var. *catenulata* proporcionaran más de un 50 % de parasitismo de huevos, aspecto a tener en cuenta cuando se deseen realizar aplicaciones preventivas (45).

#### Efecto de diferentes fuentes de materia orgánica sobre el establecimiento de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* en el suelo y la rizosfera de las plantas

La colonización del sustrato y la rizosfera del cultivo del tomate por la cepa IMI SD 187 de *P. chlamydosporia* var. *catenulata*, se estudió en sustratos de diferentes proporciones, compuestos por suelo, estiércol vacuno y humus de lombriz. Los niveles de colonización del sustrato y de las raíces del cultivo del tomate fueron altos en todos los tratamientos empleados, y existió la tendencia a que los mayores valores de colonización de raíces, se presentaran en aquellos abonos orgánicos y proporciones que permitieron una colonización media o menor del sustrato (46).

Las fuentes de materia orgánica estudiadas, se encuentran entre las más frecuentemente usadas en los sistemas intensivos de producción de hortalizas de la agricultura urbana en Cuba, donde se emplean en la conformación de canteros en cantidades superiores a 10 kg x m<sup>-2</sup>. Los resultados demuestran que dichas fuentes de materia orgánica pueden ser utilizadas como soporte para la aplicación de *P. chlamydosporia* var. *catenulata*, en las cantidades establecidas, por el Grupo Nacional de Agricultura Urbana con preferencia para el estiércol vacuno y el humus, dada su alta disponibilidad para los productores locales y el riesgo de fitotoxicidad de la gallinaza (46).

**Tabla 3.** Colonización del sustrato y raíces y capacidad parasítica de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* a diferentes concentraciones de inóculo (Tomate, 54 días). / Colonization of the substrate and roots and parasitic capacity of *P. chlamydosporia* var. *catenulata* at different concentrations of the inoculum (Tomato, 54 days).

Concentración (clamidosporas por g de sustrato)	Colonización del sustrato (10 <sup>4</sup> UFC por g)		Colonización de las raíces (10 <sup>3</sup> UFC por g)		Colonización de masas de huevos (%)		Parasitismo de huevos (%)	
	Xo	Xt*	Xo	Xt*	Xo	Xt**	Xo	Xt**
5 000	6,79	11,12 a	8,47	9,04 a	92,00	1,34 a	84,2	1,15 a
4 000	5,69	10,94 a	7,82	8,96 a	90,00	1,31 a	84,4	1,17 a
3 000	3,46	10,26 b	5,96	8,68 b	80,00	1,11 ab	76,2	1,05 a
2 000	2,76	10,21 c	4,30	8,37 c	66,00	0,95 b	62,2	0,91 b
1 000	1,59	9,67 d	2,00	7,60 d	30,00	0,57 c	25,2	0,51 c
ES		0,05		0,04		0,07		0,05

Medias con letras desiguales en las columnas, difieren significativamente para la Prueba de Rangos Múltiples de Duncan ( $p \leq 0,05$ ). \*Xt =  $\ln(Xo + 1)$ , \*\*Xt =  $\arcsen \sqrt{Xo}$ ; donde Xo es la media original y Xt la media transformada.

Otro experimento similar, se desarrolló con dos cepas seleccionadas de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (IMI SD 187 y CG1006) de Cuba y Brasil, respectivamente, frente a *M. enterolobii*, realizado en Embrapa-Cenargen, Brasilia-DF (Brasil). En este caso, los resultados indicaron que la presencia de abono orgánico no influyó de manera significativa en la actividad de la cepa nativa, pero sí de la cepa foránea (IMI SD 187) sobre todo, en el suelo natural (47).

Estos resultados se corroboraron cuando se evaluó, posteriormente, el efecto de diferentes dosis de fertilización mineral, fertilización orgánica con humus de lombriz y hongos micorrízicos arbusculares (*Glomus hoi-like*) aplicados de manera separada o en combinación, sobre el establecimiento de la cepa IMI SD 187 de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*. El experimento se realizó en sistema de cultivo protegido, y se utilizó tomate híbrido HA-3108. El análisis mostró una relación directa entre la utilización de micorriza y humus con el número de colonias de *P. chlamydosporia*, en el suelo y la raíz. La fertilización mineral tuvo una relación directa con el número de colonias en la raíz e inversa con la colonización de este hongo en el suelo. Estos resultados indicaron que los tratamientos nutricionales probados favorecieron el crecimiento *P. chlamydosporia* (IMI SD 187) y que el efecto combinado de micorriza y humus resultó ser el más significativo (48).

#### **Interacción *P. chlamydosporia* var. *catenulata*-*Rhizobium* sp.**

Al estudiar la interacción *P. chlamydosporia* var. *catenulata* - *Rhizobium* sp., no se observaron diferencias significativas en la capacidad de colonización del sustrato y raíces del cultivo de habichuela y la actividad parasítica del hongo, entre su aplicación simple y combinada con *Rhizobium* sp. Los nódulos totales y efectivos por planta, así como el peso fresco y seco de los mismos, no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos con aplicación simple de *Rhizobium* y combinada con la cepa IMI SD 187 de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* (49).

El índice de agallamiento por *M. incognita* no presentó diferencias significativas entre los tratamientos estudiados y el tratamiento control sin aplicación. Los valores más bajos de juveniles de *M. incognita* en el sustrato, se presentaron en los tratamientos que incluían la aplicación de la cepa IMI SD 187 de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* simple o combinada con *Rhizobium* sp., los que difirieron significativamente, con la aplicación simple de *Rhizobium* sp. y el tratamiento control (49).

Los resultados demostraron que no existió un efecto inhibitorio de *Rhizobium* sp. sobre *P. chlamydosporia* var. *catenulata* y viceversa. La actividad biológica

de ambos organismos también se mantuvo estable en las aplicaciones conjuntas, demostrado por la no afectación de la capacidad de nodulación de *Rhizobium* sp. y la efectividad en el control de *M. incognita* por *P. chlamydosporia* var. *catenulata* (49).

#### **Interacción *P. chlamydosporia* var. *catenulata* - *T. harzianum* - *G. clarum***

El comportamiento de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* en aplicaciones conjuntas con *T. harzianum* y *G. clarum*, mostró que los mayores niveles de colonización del sustrato se presentaron en la aplicación simple de este hongo, sin diferencias significativas con la aplicación combinada con *G. clarum*. Los menores niveles de colonización del sustrato por *P. chlamydosporia* var. *catenulata*, se obtuvieron en los tratamientos que incluían la aplicación de *T. harzianum* (*P. chlamydosporia* var. *catenulata* + *T. harzianum* y *P. chlamydosporia* var. *catenulata* + *T. harzianum* + *G. clarum*) sin diferencias significativas entre sí. En cuanto a la colonización de las raíces y la colonización de masas de huevos por *P. chlamydosporia* var. *catenulata*, no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos. Los mayores valores de parasitismo de huevos se obtuvieron con la aplicación combinada de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* + *T. harzianum* + *G. clarum*, el cual difirió significativamente, del resto de los tratamientos (49).

Aun, cuando la colonización del sustrato por *P. chlamydosporia* var. *catenulata* se vio afectada por la presencia de *T. harzianum*, la actividad parasítica no sufrió afectación, ya que la población se mantuvo dentro de los rangos que proporcionan una buena efectividad para el ACB. En la colonización del sustrato por *T. harzianum* no se notaron diferencias significativas entre la aplicación simple del ACB y combinado con *P. chlamydosporia* var. *catenulata* y *G. clarum*. El estudio de la actividad micorrizógena de *G. clarum* en aplicaciones conjuntas con *P. chlamydosporia* var. *catenulata* y *T. harzianum* en el cultivo del tomate, mostró que los mayores porcentajes de colonización micorrícica, densidad visual y peso endófito se presentaron en el tratamiento combinado de *G. clarum* + *P. chlamydosporia* var. *catenulata* + *T. harzianum*, con diferencias significativas respecto a la aplicación simple de *G. clarum* y combinada con *P. chlamydosporia* var. *catenulata* (49).

Al analizar el efecto de los agentes biológicos estudiados sobre las afectaciones y poblaciones de *M. incognita*, se observó que no se presentaron diferencias entre los diferentes tratamientos, en cuanto al índice de agallamiento, en el cultivo de tomate. Sin embargo, los menores valores de juveniles de *M. incognita* en el sustrato, se obtuvieron en aquellos

que incluían al hongo nematófago *P. chlamydosporia* var. *catenulata* con diferencias significativas con el resto de los tratamientos (49).

### Influencia de la planta hospedante sobre la colonización de la rizosfera por *P. chlamydosporia* var. *catenulata*

La capacidad de colonización de la rizosfera de diferentes especies hortícolas por *P. chlamydosporia* var. *catenulata*, varió en dependencia de la especie utilizada. Los valores más altos de UFC por cm<sup>2</sup> de raíz, se obtuvieron en la col, coliflor, acelga, tomate, pepino (*Cucumis salivus* L.) y pimiento (*Capsicum annum* L.), los que superaron las 200 UFC por cm<sup>2</sup> de raíz. Un crecimiento moderado del hongo, se presentó en la habichuela, brócoli, berenjena y espinaca, con valores entre 100 y 200 UFC por cm<sup>2</sup> de raíz. En los cultivos de quimbombó, perejil y apio se produjo un pobre crecimiento de *P. chlamydosporia* var. *catenulata*, con densidades menores de 100 UFC por cm<sup>2</sup> de raíz (50). (Tabla 4)

### Influencia de *M. incognita* sobre la colonización de la rizosfera por *P. chlamydosporia* var. *catenulata*

Los cultivos de tomate, habichuela y quimbombó, seleccionados a partir del ensayo anterior por su diferente respuesta ante la colonización por

*P. chlamydosporia* var. *catenulata*, mostraron una mayor abundancia del hongo en las plantas infestadas, con diferencias significativas respecto a las plantas sanas. (Tabla 5)

En el cultivo de la habichuela, aunque resultó un hospedante moderado de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* en el ensayo anterior, se llegaron a alcanzar densidades por encima de las 200 UFC por cm<sup>2</sup> de raíz en las plantas infestadas con *M. incognita*. El cultivo de la habichuela puede ser considerado entonces, como un buen hospedante del hongo, según la escala establecida por Kerry (51).

Los resultados ofrecen una alternativa práctica para el empleo de *P. chlamydosporia* var. *catenulata*, como ACB en sistemas intensivos de producción de hortalizas, donde un gran número de cultivos son hospedantes de *M. incognita*. Quedó demostrado que cultivos resistentes a *M. incognita*, como la col, coliflor y acelga son buenos hospedantes del hongo, por lo que podrían contribuir a su proliferación y sobrevivencia en el suelo. Por otra parte, la habichuela, que se utiliza comúnmente como cultivo de rotación con el objetivo de mejorar la fertilidad del suelo, a partir de la fijación biológica del nitrógeno (52, 53), mostró ser un buen hospedante del hongo en presencia de *M. incognita*.

Por tanto, la utilización de estos cultivos dentro de un esquema de rotación, que incluya la aplicación de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* como ACB, puede

**Tabla 4.** Colonización de la rizosfera de diferentes especies hortícolas por *P. chlamydosporia* var. *catenulata*. / Colonization of the rhizosphere of different horticultural species by *P. chlamydosporia* var. *catenulata*.

Especie	Cultivar	Colonización de la rizosfera (UFC por cm <sup>2</sup> raíz)	Tipo de hospedante Según Kerry (52)
Col	Hércules	619,57	Bueno
Coliflor	Verano-6	489,13	Bueno
Acelga	PakChoi Canton	452,55	Bueno
Tomate	Amalia	424,73	Bueno
Pepino	Tropical SS-5	261,31	Bueno
Pimiento	Español	251,32	Bueno
Habichuela	Lina	171,91	Moderado
Brócoli	Tropical F-8	155,74	Moderado
Berenjena	FHB-1	112,28	Moderado
Espinaca	Baracoa	110,00	Moderado
Quimbombó	Tropical C-17	73,04	Pobre
Apio	UTA	61,79	Pobre
Perejil	KD-77	60,38	Pobre

**Tabla 5.** Colonización de la rizosfera por *P. chlamydosporia* var. *catenulata* en plantas sanas e infestadas por *M. incognita*. / Colonization of the rhizosphere by *P. chlamydosporia* var. *catenulata* in healthy plants and plants infested by *M. incognita*.

Cultivos	Tipo de hospedante del hongo	Colonización de la rizosfera (UFC por cm <sup>2</sup> de raíz)			
		Plantas sanas		Plantas infestadas	
		Xo	Xt ± DS	Xo	Xt ± DS
Tomate	Bueno	440,61	6,08 ± 0,17 b	604,97	6,40 ± 0,16 a
Habichuela	Moderado	163,50	5,10 ± 0,08 b	221,38	5,40 ± 0,12 a
Quimbombó	Pobre	67,70	4,24 ± 0,16 b	86,80	4,47 ± 0,08 a

Medias con letras desiguales en las filas, difieren significativamente para la Prueba de t de Student ( $p \leq 0,05$ ). \*Xt = ln (Xo + 1).

proporcionar resultados satisfactorios en el manejo de *M. incognita* en sistemas intensivos de producción de hortalizas. Estos resultados acerca de la determinación de la capacidad hospedante de diferentes especies de plantas hortícolas, son los primeros realizados en el mundo para *P. chlamydosporia* var. *catenulata*.

Los equipos de investigación de Cuba y Brasil trabajaron de conjunto en estos aspectos. Previamente, se habían efectuado experimentos en condiciones controladas para evaluar el efecto *P. chlamydosporia* sobre una población de *M. enterolobii*, creciendo en plantas de guayaba (*Psidium guajava* L.). El efecto de los tratamientos se evaluó, luego de seis meses. Aunque la infección en las plantas no se atenuó, el número de huevos. g de raíz<sup>-1</sup> disminuyó de manera significativa. El número de masas de huevos infectadas mostró una correlación inversa con el número de huevos encontrados en las raíces. El aislamiento CG1003 de *P. chlamydosporia*, (originalmente aislado de huevos de *M. enterolobii* en Brasil), alcanzó el 61,5 % de control. Los autores sugirieron que *P. chlamydosporia* puede ser seleccionado, como potencial agente de control biológico para su introducción en un manejo integrado de *M. enterolobii* en guayaba con otras tácticas (54). Seguidamente, se evaluó la actividad saprofítica y patogénica de tres cepas brasileñas (CG1003, CG1006 y CG1041) y de la cubana IMI SD 187 de *P. chlamydosporia* frente a *M. enterolobii*, en una sucesión de cultivos tomate - lechuga (*Lactuca sativa* L.). Al finalizar el ciclo de los cultivos, seis meses después de la aplicación, se comprobó que la colonización de *P. chlamydosporia* se mantuvo en el orden de 10<sup>4</sup> UFC.g<sup>-1</sup> de suelo y mayor de 10<sup>3</sup> UFC.g<sup>-1</sup> en las raíces, excepto para la cepa CG1041 (10<sup>2</sup> UFC.g<sup>-1</sup> de raíz). El porcentaje de colonización de estos hongos sobre las masas de huevos, fue superior al 60 % en todos los tratamientos; mientras que, los porcentajes de parasitismo de huevos estuvieron entre el 45 y 55 %. Estos resultados validaron la cepa cubana frente a una diana, y en condiciones diferentes a la que es originaria, en tanto se demostró que las cepas brasileñas son potenciales biocontroladores de *M. enterolobii*, abriéndose así futuras perspectivas de investigación como agentes de control biológico integrados para el manejo de este nematodo (55).

### **Efectividad de la aplicación de dos tipos de inóculo de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* dentro de una secuencia de cultivo para el manejo de poblaciones de *Meloidogyne incognita***

#### **Estudio en condiciones de aisladores biológicos**

El establecimiento de dos tipos de inóculo de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* (sustrato colonizado y clamidosporas puras) y su densidad poblacional sobre una secuencia de cultivos tomate-habichuela-

tomate, en presencia o no de *M. incognita*, se observa en la Figura 19. El hongo se estableció y proliferó en el sustrato y raíces de ambos cultivos, durante todo el desarrollo del experimento y con poblaciones que se encontraban en un rango de 5 a 6 x 10<sup>4</sup> UFC en el sustrato. El número de UFC para las dos formas de inóculo utilizadas, se incrementó en los tratamientos infestados por *M. incognita* (56).

En el primer cultivo de tomate, las mayores poblaciones se observaron en las plantas infestadas sin diferencias significativas para los dos tipos de inóculo. En las plantas sanas, las mayores poblaciones del hongo en el sustrato, se obtuvieron para la aplicación de clamidosporas puras; mientras que, la colonización de raíces fue superior para el sustrato colonizado. En el cultivo de la habichuela y en el último tomate, las mayores cantidades de UFC del hongo en el sustrato, se observaron en las plantas infestadas por *M. incognita* y tratadas con sustrato colonizado por el hongo. Las UFC del hongo en las raíces fueron significativamente superiores para ambos tipos de inóculo en plantas infestadas, con respecto a las plantas sanas y sin diferencias significativas entre sí (56).

La presencia del hongo, también fue demostrada por la colonización del 80 al 85 % de las masas de huevos y parasitismo del 70 al 75 % de huevos de *M. incognita* con ambos tipos de inóculo, sin diferencias significativas entre ellos, tanto para el cultivo del tomate como en la habichuela, aun cuando estos mostraron diferentes índices de agallamiento. En el último cultivo de tomate, aunque hay un ligero incremento en el índice de agallamiento con respecto a la habichuela, debido a la respuesta altamente susceptible del cultivar, este no superó el grado 2 en los tratamientos, en los cuales se aplicó el hongo. De igual forma, se obtuvo un menor número de hembras y masas de huevos en los tratamientos en los que se aplicó el hongo, con diferencias significativas con el control. Esta respuesta favoreció que también en este cultivo, un mayor número de masas de huevos quedaran expuestas a la acción del ACB, incrementando su eficacia y proporcionando una reducción significativa en el número de juveniles infestivos en los tratamientos en que se aplicó el hongo, con respecto al control (56).

Además, se comprobó que la reducción de las afectaciones por *M. incognita* en los tratamientos inoculados con *P. chlamydosporia* var. *catenulata*, tuvo un efecto positivo sobre el desarrollo vegetativo de las plantas. Este comportamiento fue similar para los dos tipos de inóculo del hongo. La utilización de clamidosporas puras tiene como ventajas, que el producto puede ser almacenado por mayor tiempo, existe menos posibilidad de contaminación y es más fácil de transportar, ya que se precisan menores cantidades. Sin embargo, la separación de las clamidosporas del sustrato necesita un mayor

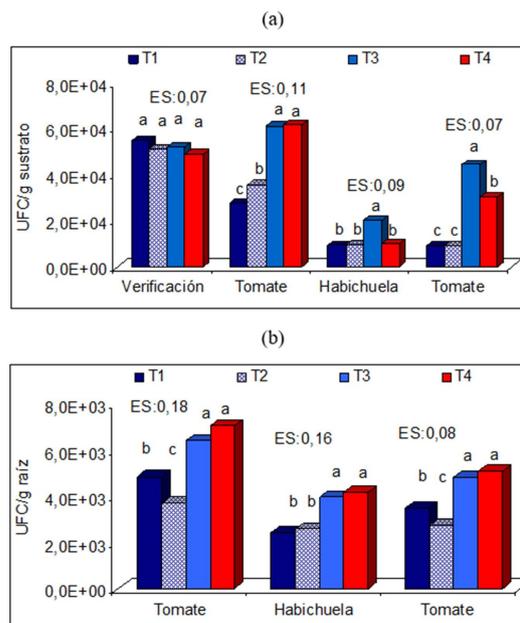
procesamiento del inóculo, el cual requiere más tiempo, existe el peligro de mayor exposición para el operario e incrementa los costos. Por esta razón, en el caso del sustrato colonizado, los productores pueden contar con un producto local más barato (56).

Esta experiencia se extendió a condiciones naturales de campo y durante un período más prolongado de tiempo, donde una mayor cantidad de factores pueden influir sobre la eficacia del hongo, la reproducción del nematodo y el crecimiento de las plantas.

### Estudio en condiciones de campo

El experimento se desarrolló sobre un suelo ferralítico rojo lixiviado, en un área anteriormente plantada con los cultivos de tomate y pimiento con bajos niveles de infestación por *M. incognita* (Grados 1-2). Los tratamientos fueron los siguientes: 1- Sustrato colonizado con la cepa IMI SD 187 de *P. chlamydosporia* var. *catenulata*, 2- Clamidosporas puras de la cepa IMI SD 187 de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* y 3- Control (no tratado). Para ambos tratamientos del hongo, se aplicaron 5 000 clamidosporas por g de suelo, a una profundidad de 15 cm. El inóculo se mezcló con humus de lombriz para su aplicación, en cantidades correspondientes a 1 kg del material orgánico por m<sup>2</sup> de suelo. Se realizaron dos aplicaciones dentro de un esquema de rotación de cultivos, conformado por Tomate cv. 'Amalia' - Tomate cv. 'Amalia' - Col cv. 'Hércules' - Habichuela cv. 'Lina' - Tomate cv. 'Amalia' - Tomate cv. 'Amalia' - Habichuela cv. 'Lina' - Tomate cv. 'Amalia' a. Las aplicaciones se realizaron en la primera plantación de tomate (17 de septiembre de 2003) y en la tercera plantación de tomate (17 de noviembre de 2004) (56).

A partir del momento de la aplicación de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* en el primer cultivo de tomate, la presencia del hongo fue detectada con un comportamiento similar para ambos tipos de inóculo en todas las evaluaciones realizadas, lo que corroboró los resultados obtenidos en condiciones de aisladores biológicos. La población del hongo se incrementó durante cada ciclo de cultivo, mostrando los menores valores en el primer momento de muestreo y los valores más altos de UFC, al final del ciclo. Sin embargo, las poblaciones del hongo en el suelo fueron decreciendo, y su capacidad de colonización de las raíces también disminuyó, hasta alcanzar los valores mínimos en los meses de verano del año 2004, por lo que se realizó una segunda aplicación del hongo en el cultivo de tomate, que correspondía dentro de la rotación; 14 meses después de la primera. Con la segunda aplicación, la población del hongo se incrementó nuevamente y de manera similar a lo sucedido con anterioridad; los mayores valores se obtuvieron al finalizar cada ciclo de cultivo. Sobresalió, que la



**Figura 19.** Poblaciones de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* en el sustrato (a) y en las raíces de los cultivos de tomate y habichuela (b) en un sistema de rotación tomate-habichuela-tomate. Medias con letras desiguales, difieren significativamente para la Prueba de Rangos Múltiples de Duncan ( $p \leq 0,05$ ). \*T1: Plantas sanas/sustrato colonizado, T2: Plantas sanas/clamidosporas puras, T3: Plantas infestadas *M. incognita*/sustrato colonizado, T4: Plantas infestadas *M. incognita*/clamidosporas puras. / Populations of *P. chlamydosporia* var. *catenulata* in the substrate (a) and on the roots of tomato and bean crops (b) in a tomato-bean-tomato rotation system. Means with no common letters differ significantly for Duncan's Multiple Range Test ( $p \leq 0.05$ ). \*T1: Healthy plants/colonized substrate, T2: healthy plants/pure chlamydo spores, T3: plants infested with *M. incognita*/colonized substrate, T4: plants infested with *M. incognita*/pure chlamydo spores.

marcada disminución en las poblaciones del hongo, se correspondió con las temperaturas promedio del suelo más altas durante todo el período objeto de estudio, las cuales alcanzaron valores superiores a 35°C (56).

Aunque la colonización de masas de huevos presentó diferencias significativas entre los dos tipos de inóculo del hongo en los dos primeros cultivos de tomate, no se presentaron diferencias significativas entre ambos para el parasitismo de huevos (Fig. 20). En los restantes cultivos, ambos tipos de inóculo mostraron similar actividad parasítica, sin diferencias significativas entre sí. Los porcentajes de parasitismo de huevos más altos (superiores a 80 %) se obtuvieron en el tercer cultivo de tomate; teniendo como antecedente que al inicio de este ciclo de cultivo, se realizó una segunda aplicación del hongo (56).

Los resultados de este experimento demostraron que la aplicación de dos tipos de inóculo de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* junto a otras

tácticas de manejo, dieron lugar a la reducción de poblaciones y daños causados por *M. incognita*, y permitió mantener un control estable y duradero durante 887 días en condiciones de campo. Se logró una reducción significativa en el número de nematodos en dos ciclos de tomate consecutivos, después de la rotación con un cultivo no hospedante y un pobre hospedante de *M. incognita*, y una segunda aplicación del hongo, situación que se mantuvo hasta el final del experimento, cuando se obtuvieron los valores más bajos, lo cual sugiere que algún grado de supresión haya sido generado en el suelo (56).

Estos resultados validan las características mostradas con anterioridad por *P. chlamydosporia* var. *catenulata* como buen parásito, buen colonizador, capacidad de sobrevivencia y adaptación al suelo una vez aplicado (2, 57) y reafirman las potencialidades mostradas como ACB de *M. incognita*, en estudios previos, en pequeñas parcelas en campo (24, 25, 43). Además, constituyen los primeros estudios desarrollados en el mundo acerca del monitoreo del hongo en el suelo y la influencia de factores climáticos

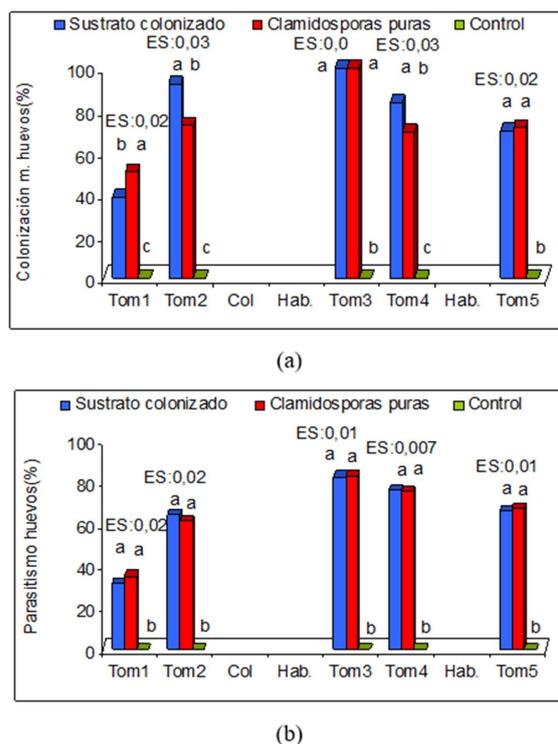
#### Interacción entre cepas de *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* y *P. chlamydosporia* var. *catenulata*

La PCR en tiempo real fue un método sensible y reproducible, y demostró que las raíces y agallas de los nematodos no fueron uniformemente colonizadas por el hongo. Los resultados indicaron que el aislamiento de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* fue más abundante en raíces y huevos que el aislado de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*, pero ambos aislados infectaron, en igual proporción, los huevos del nematodo. La abundancia de cada aislado fungoso se redujo en las variantes de coinoculación, en comparación con las inoculaciones simples, pero el número de segmentos de raíces y agallas colonizadas no fue diferente, significativamente (58).

De forma general, se demostró que es posible aplicar mezclas de cepas. Las mezclas de las cepas de las dos variedades dieron mejores resultados que aplicarlas por separado, con valores superiores en los porcentajes de infección de huevos y un alto porcentaje de agallas co - infectadas (95 %). Parece haber un efecto de sinergismo pues, aunque la cantidad de ADN recuperada en las masas de huevos es menor, el porcentaje de huevos infectados fue mayor (57).

#### Determinación del impacto de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* sobre poblaciones de microorganismos y nematodos del suelo

El análisis de suelo mostró que con la adición de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* se redujeron



**Figura 20.** Colonización de masas de huevos (a) y parasitismo de huevos (b) de *M. incognita* por *P. chlamydosporia* var. *catenulata* en un sistema de rotación tomate-tomate-col-habichuela-tomate-tomate-habichuela-tomate. Medias con letras desiguales, difieren significativamente para la Prueba de Rangos Múltiples de Duncan ( $p \leq 0,05$ ). / Colonization of egg masses (a) and egg parasitism (b) of *M. incognita* by *P. chlamydosporia* var. *catenulata* in a tomato-tomato-cabbage-bean-tomato-tomato-bean-tomato rotation system. Means with no common letters differ significantly for Duncan's Multiple Range Test ( $p \leq 0.05$ ).

significativamente las poblaciones de *M. incognita* en suelo, respecto al tratamiento control sin aplicación, y no se presentaron diferencias significativas entre ambos tratamientos para el resto de los nematodos fitoparásitos, así como para los nematodos de vida libre (saprobióticos) presentes en el área (Tabla 6) (55).

Al analizar las poblaciones bacterianas y fúngicas se observó que no existían diferencias significativas entre la aplicación de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* y el tratamiento control. Los resultados demostraron la especificidad del hongo, como parásito de huevos de nematodos formadores de agallas, al no causar afectaciones a otros géneros de nematodos y fundamentalmente, a los nematodos de vida libre que son usados como bioindicadores de la salud del suelo. La determinación del impacto de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* sobre organismos no diana, es esencial para su registro como agente de control biológico (55).

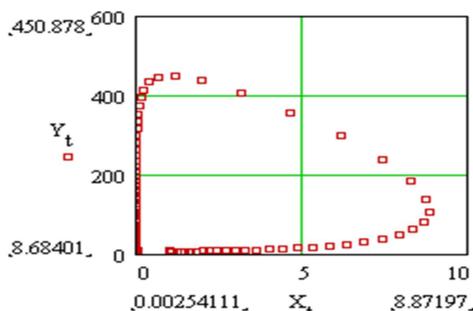
**Tabla 6.** Poblaciones de *M. incognita* y otros nematodos fitoparásitos y saprobióticos en suelo tratado y no tratado con *P. chlamydosporia* var. *catenulata*. / Populations of *M. incognita* and other plant-parasitic and saprobiotic nematodes in soil treated and not treated with *P. chlamydosporia* var. *catenulata*.

Tratamientos	Poblaciones de nematodos / 10 g de suelo					
	<i>M. incognita</i>		Otros fitoparásitos		Saprobióticos	
	Xo	(Xt ± DS)	Xo	(Xt ± DS)	Xo	(Xt ± DS)
Aplicación de <i>Pochonia</i>	0,17	1,07±0,12 b	18,11	4,31±0,75 a	14,39	3,75±1,25 a
Suelo sin tratar	1,50	1,56±0,22 a	25,22	5,01±1,14 a	6,00	2,59±0,56 a

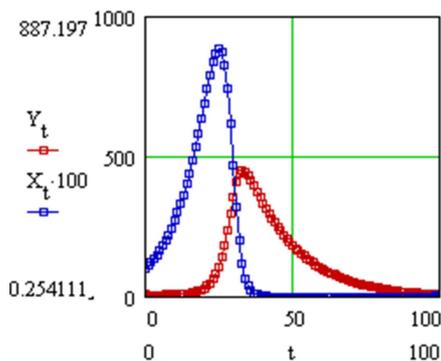
Medias con letras desiguales en las columnas, difieren significativamente para la Prueba de t de Student ( $p \leq 0,05$ ). \*Xt =  $\sqrt{(X_0+1)}$ .

**Modelación de la actividad parasítica de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* sobre *Meloidogyne incognita***

El modelo muestra que *P. chlamydosporia* var. *catenulata* podría reducir las densidades del nematodo a valores tan bajos, que inducirían una extinción local de *M. incognita* (Fig. 21 y 22)(59).



**Figura 21.** Representación del ciclo nematodo-hongo en el espacio de fases de juveniles (X) y UFC Raíz (Y). / Representation of the nematode-fungus cycle in the phase space of juveniles (X) and Root CFU (Y).

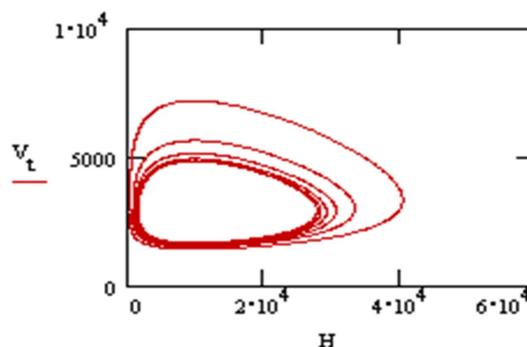


**Figura 22.** Dinámica de  $J_2$  (*M. incognita*) y UFC Raíz (*P. chlamydosporia* var. *catenulata*) estimadas por un modelo presa-depredador. / Dynamics of  $J_2$  (*M. incognita*) and Root CFU (*P. chlamydosporia* var. *catenulata*) estimated by a prey-predator model.

Se estableció una relación denso-dependiente entre ambos organismos, en la cual el parasitismo es una función de la densidad del hospedante y la densidad del hospedante es una función del parasitismo. El modelo es una simplificación de lo que ocurre en el suelo, y prueba que el hongo puede producir un control eficaz del nematodo.

Se propuso un modelo de estructura de fases, que representa el ciclo real del nematodo, en el cual no solo se atribuyen las pérdidas en las poblaciones del nematodo a su interacción con el hongo, sino que se atribuye la mortalidad a otras causas, y además, se tiene en cuenta la interacción con el cultivo hospedante. Este modelo mostró una tendencia a la estabilidad en una escala temporal expresada en horas. Se definieron seis generaciones en un periodo de cinco meses, con picos y fluctuaciones de densidades para cada fase del nematodo. El número total de hembras adultas apareció en más bajas densidades que los restantes estadios. Los huevos y juveniles parten de un punto inicial cero y se incrementan rápidamente, tal como ocurre en las condiciones naturales. Su densidad va luego decreciendo de manera cíclica en el tiempo, hasta alcanzar la estabilidad (59).

La biomasa del hongo sufre un descenso inicial, seguido por un rápido incremento. Posteriormente, las densidades disminuyen con fluctuaciones que alcanzan la estabilidad en el tiempo, lo que demuestra la capacidad del hongo para establecerse en el suelo después de su aplicación. Se mostró una relación cíclica, representada por una curva cerrada dentro del plano que atrae a las trayectorias, acercándose cada vez más en el tiempo hacia un ciclo límite o región de equilibrio (Fig. 23). Este ciclo límite, se considera estable; el hongo ejerce control sin que se produzca el exterminio de alguna de las especies, ya que se establece el equilibrio.



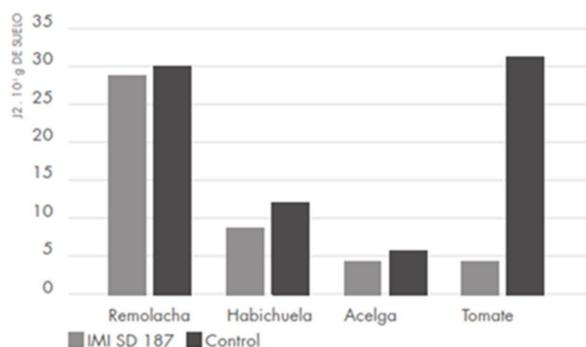
**Figura 23.** Representación del ciclo nematodo hongo en el espacio de fase de número total de huevos (H) vs. biomasa total del hongo (V). / Representation of the fungal nematode cycle in the phase space of total number of eggs (H) vs. total biomass of the fungus (V).

Este es un método útil para el estudio de *P. chlamydosporia* var. *catenulata*, y su relación con *M. incognita* ya que a través del mismo se puede describir la relación entre ambos organismos, quedando demostrada su efectividad en la predicción del comportamiento de la interacción (59)

### Validación en áreas del Organopónico de Alamar

El primer ensayo de validación de esta estrategia, se realizó en el organopónico de Alamar, La Habana, Referencia Nacional del Movimiento de Agricultura. Se utilizaron canteros altamente infestados con *M. incognita* ( $3 J_2.g^{-1}$  de suelo) donde, previamente, se plantó remolacha. Posterior a la aplicación del hongo ( $10 g. m^2$  de sustrato colonizado) se plantaron dos cultivos pobres hospedantes de nematodos (frijol y acelga) y finalmente, un cultivo altamente susceptible (tomate) (59).

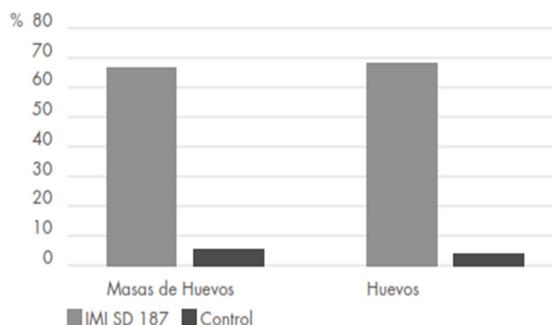
Los ciclos sucesivos de frijol y acelga tuvieron un significativo efecto en la reducción de la infestación de nematodos en el suelo (Fig. 24). La aplicación del hongo tuvo un efecto adicional pequeño en estos dos primeros ciclos de cultivos pobres hospedantes de nematodo, pero previno un significativo incremento de la población de nematodos en el suelo, en el siguiente cultivo susceptible a nematodos. En los suelos no tratados, las poblaciones de nematodos se incrementaron significativamente a los niveles iniciales, después de cosechada la remolacha. El hongo se recobró en más del 70 % de las masas de huevos y huevos en las raíces de tomate a los 96 días después del tratamiento (ddt) (Fig. 25).



**Figura 24.** Número de juveniles ( $J_2$ ) de *Meloidogyne incognita* en suelos no tratados y tratados con *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* IMI SD187, antes de plantar la habichuela en una rotación con acelga y tomate. / Number of juveniles ( $J_2$ ) of *Meloidogyne incognita* in untreated soils and treated with *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* IMI SD187 before planting the beans in a rotation with chard and tomato

### Estrategia de Biomanejo en Cultivos Protegidos

Se elaboró un proyecto del Programa Nacional de Ciencia y Técnica de Biotecnología Agropecuaria para el periodo 2008-2010, en el cual se evaluó la



**Figura 25.** Proporción de masas de huevos de *Meloidogyne incognita* colonizadas y huevos parasitados en raíces de tomate cultivado en suelos no tratados y tratados con el hongo *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* IMI SD187. / Proportion of colonized *Meloidogyne incognita* egg masses and parasitized eggs on tomato roots grown in untreated soils and treated with the fungus *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* IMI SD187.

efectividad del hongo (KlamiC) en seis escenarios productivos de cuatro provincias del país.

En ensayos realizados en el Módulo Ecuador de la Empresa de Cítricos de Jagüey Grande, inicialmente se evaluó la estabilidad del hongo en las condiciones de manejo de la empresa. Posteriormente, se evaluó KlamiC en aplicaciones combinadas con Hebernem® (60) durante dos ciclos de cultivo consecutivo (pepino cv. 'HA-436' y tomate cv. 'HA-3047').

En el primer ensayo, dentro de las parcelas tratadas, las poblaciones del hongo se mantuvieron estables en un rango de  $2,4-2,7 \times 10^4$  UFC.g<sup>-1</sup> de suelo hasta los 60 ddt. A partir de este momento, se observó una tendencia a disminuir las poblaciones del hongo hasta el final del cultivo (132 ddt) con  $1,5 \times 10^4$  UFC.g<sup>-1</sup> de suelo; aunque se observó un incremento de la concentración de hongo en las raíces, hasta niveles superiores a las  $2,5 \times 10^3$  UFC.g<sup>-1</sup> de raíz. Al extraer masas de huevos de las plantas infestadas con *Meloidogyne* spp., se evidenció que más del 44 % estaban colonizadas por el hongo y que el 62 % de los huevos, dentro de estas, fueron parasitados. Este resultado evidenció que el hongo pasa de una actividad saprofitica en el suelo a parasítica en la raíz, en la medida que se incrementó la población de los nematodos en las raíces.

En el segundo ensayo, los resultados obtenidos demostraron que la aplicación combinada de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (KlamiC) con HeberNem®, logró reducir los niveles de infestación de la plaga y obtener similares rendimientos, comparado con los tratamientos de Agrocelhone, a partir del segundo ciclo de cultivo.

Otras investigaciones se realizaron en el módulo de cultivos protegidos de Veguita, municipio Yara, provincia Granma, en el periodo comprendido de mayo 2009 a octubre 2011. Durante este tiempo, se establecieron seis secuencias de cultivos (pepino, tomate o pimiento) en dos unidades experimentales

(casas de 540 m<sup>2</sup>) ubicadas sobre suelo aluvial. Las secuencias de cultivos fueron las siguientes: Ciclo 1, pepino 'HA 454' de Mayo 2009 a Julio 2009; Ciclo 2, tomate 'Andromeda' de Septiembre 2009 a Diciembre 2009; Ciclo 3, tomate 'FA 516' de Enero 2010 a Abril 2010; Ciclo 4, pimiento 'FAR' del 3 de Junio 2010 a Septiembre 2010; Ciclo 5, tomate 'FA 180' de Noviembre 2010 a Marzo 2011 y Ciclo 6, pepino 'INIVIT P-2007' de Agosto 2011 a Octubre 2011. En cada una de las unidades experimentales, se realizaron de forma independiente los dos tratamientos: KlamiC y HeberNem®. Se aplicó HeberNem® a razón de 1 ml.m<sup>2</sup> siete días antes del trasplante, y 14 y 35 ddt (61). Mientras que, KlamiC, se utilizó a razón de 10 g.m<sup>2</sup> en suspensión, en el momento del trasplante.

Se constató que el índice de agallamiento en el último ciclo de cultivo fue menor donde se aplicó KlamiC, respecto a HeberNem®. KlamiC, logró índice de agallamiento proyectado de cero en solo 37 meses; mientras que, el de HeberNem® fue de 53 meses. La intensidad y distribución de *M. incognita*, en ambos tratamientos, tuvo una tendencia a decrecer en el transcurso del tiempo, pero en la última evaluación, KlamiC, tuvo una respuesta más favorable.

#### Otros estudios realizados encaminados a la aplicación de KlamiC como bioproducto en diferentes condiciones y para otros usos diferentes de su capacidad como hongo nematofago

Una serie de experimentos se encaminaron a la posibilidad de la aplicación de KlamiC en suelo con elevado grado de salinidad. Los ensayos *in vitro* para el análisis de la tolerancia de la cepa IMI SD 187 frente a diferentes concentraciones salinas (2dS.m<sup>-1</sup>, 4dS.m<sup>-1</sup>, 6dS.m<sup>-1</sup>, 8dS.m<sup>-1</sup>, 10dS.m<sup>-1</sup>, 12dS.m<sup>-1</sup>, 14dS.m<sup>-1</sup> y 16dS.m<sup>-1</sup> de NaCl) demostraron, que las clamidosporas fueron más tolerantes que los conidios, con inhibición de 50 % de la germinación a 13dS.m<sup>-1</sup> y 12dS.m<sup>-1</sup>, respectivamente (62).

En los siguientes ensayos se analizó el efecto de diferentes concentraciones de NaCl (40, 80, 120 y 160 mmol.L-1) *in vitro* (medio PDA) y en suelo, sobre el crecimiento micelial y la esporulación. *In vitro*, la menor inhibición se obtuvo a la concentración de 40 mmol.L-1 de NaCl (6,55 % del área de la colonia y 21,57 % en la esporulación). El tratamiento de 160 mmol.L-1 causó las mayores afectaciones, con valores de 51,35 % y 85,17 %, respectivamente. En el ensayo en suelo, la menor inhibición del área de la colonia 11,59 % se alcanzó con la concentración de 40 mmol.L-1 y la mayor 33,50 % se constató a 160 mmol.L-1 (63). Estos resultados sirvieron de base para el análisis del efecto de la salinidad en la interacción del hongo sobre *M. incognita*, en el cultivo del tomate como hospedante. Los resultados obtenidos demostraron que la cepa IMI SD 187 colonizó la

raíz en un rango de 1,9-4,2 x 10<sup>3</sup> UFC, registró una población en el suelo de 1,5-3,3 x 10<sup>4</sup> UFC, parasitó 63 % de huevos y colonizó 80 % de masas de huevos de *M. incognita*, en presencia de la concentración de NaCl utilizada (64).

El tipo de suelo también fue objeto de estudio, especialmente por las características propias de los mismos y en particular, por el pH y su posible efecto sobre el establecimiento del hongo. De esta forma, se evaluaron *in vitro* tres tipos de suelos agrícolas cubanos de los tipos Ferralítico, Fluvisol y Pardo, utilizando la técnica suelo-membrana. Se demostró que, *P. chlamydosporia* var. *catenulata* creció y produjo clamidosporas en todas las condiciones edáficas evaluadas, no obstante, el mayor crecimiento se registró en los suelos Fluvisol y Ferralítico, comparado con el Pardo. Este resultado sugirió, que las mayores poblaciones microbianas nativas y el pH ácido presente en el suelo pardo, pudieron afectar el crecimiento de este hongo. Se confirmó que la especie fúngica nematófaga *P. chlamydosporia* var. *catenulata* posee capacidad de adaptación, persistencia y multiplicación en diferentes suelos, y se sugiere su utilización en los suelos fluvisol, ferralítico y pardo, siempre que no presenten un pH ácido ≤ 4,17 (65).

Otro aspecto importante, es el efecto que pueden tener sobre *Pochonia chlamydosporia* diferentes plaguicidas y bioestimulantes, por lo cual pueden ser utilizados dentro de las estrategias de manejo diseñadas para plagas en las que se utiliza también este agente de control biológico. Por estas razones, se evaluaron el crecimiento micelial y la producción de clamidosporas, frente a un grupo de estos químicos y bioactivos. La germinación de clamidosporas fue superior al 50 % con los tratamientos control, FitoMas E, Biobras-16 y Amidor. El crecimiento fúngico se potenció con Biobras-16 al 106,23 %, lo promovieron entre un 50-100 % el control, FitoMas E y Cuproflow. La producción de clamidosporas se estimuló con Cipermetrina, Benomilo, Zineb, Mitigan, Karate, FitoMasE y Amidor. Fueron compatibles con *P. chlamydosporia*: Cipermetrina, Karate, Amidor, Benomilo, Zineb, Mitigan y FitoMas E (66).

El efecto de *P. chlamydosporia* (IMI SD 187) sobre semillas de tomate del cultivar 'Vyta', fue similar al comportamiento observado en el control sin inocular. No obstante, con relación a la variable altura de las plántulas, a los 20 y 25 días, se encontraron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) correspondiendo el menor crecimiento donde fue inoculado el hongo, lo que pudiera estar relacionado con la respuesta de las plántulas, frente a la presencia del hongo en su sistema radical (67).

El recubrimiento de las semillas de frijol del cultivar 'Cuba Cueto 25-9' N con esporas de *P. chlamydosporia* (IMI SD 187) con una concentración de 1,5 x 10<sup>7</sup> clamidosporas.g-1 y

10 % de arcilla, tuvo un efecto positivo sobre la velocidad de germinación, longitud de la radícula y el hipocotilo, diámetro del hipocotilo y la masa fresca de la plántula, así como el número de raíces secundarias. Cuando las semillas se recubrieron y se realizó una aplicación de *P. chlamydosporia* cinco días después de la siembra, a los siete días se observó 100 % de germinación de las semillas, dos días antes que los tratamientos T1 (control sin *Pochonia*), T2 (*Pochonia* en recubrimiento a las semillas) y T3 (*Pochonia* en suspensión). Se observó una tendencia al incremento en 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 (68).

Otra investigación estuvo dirigida a determinar la actividad endofítica de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* cepa IMI SD 187 (KlamiC®) y su efecto en la promoción del crecimiento de vitroplantas de plátanos y bananos. Se utilizaron los cultivares ‘CEMSA –’ (AAB), ‘Pisang Ceilan’ (AAB), ‘FHIA-01’ (AAAB) y ‘FHIA-18’ (AAAB). Las vitroplántulas se trasplantaron a bandejas de polipropileno y bolsas de polietileno negro, con sustrato de estiércol vacuno, y posteriormente se distribuyeron, de manera aleatoria, en el área de aclimatización. Se efectuaron dos aplicaciones de KlamiC® (5,6 x 10<sup>5</sup> clamidosporas.vitroplanta<sup>-1</sup>). Los autores observaron un incremento significativo del crecimiento de las vitroplantas tratadas con KlamiC®, en comparación con los controles. El hongo colonizó el sustrato y la rizosfera de las vitroplantas, con menor porcentaje en el cultivar ‘FHIA-18’ (AAAB) con 4,15 % (69).

Posteriormente, se evaluó la combinación *in vitro* y *ex vitro* de *P. chlamydosporia* (IMI SD 187) y *Trichoderma asperellum* (Ta. 13) en la aclimatización de vitroplantas del banano de cocción del tipo Bluggoe (AABB) ‘FHIA-03’. La compatibilidad *in vitro* se determinó mediante la competencia por espacio (crecimiento radial) y el porcentaje de inhibición del crecimiento a las 24, 48 y 120 h en Cultivo Dual. Posteriormente, se evaluó la aplicación de estos hongos de manera independiente o en combinación, durante la fase de adaptación *ex vitro* de vitroplantas, y un control sin aplicación; en total 12 tratamientos. Las vitroplantas se plantaron en bandejas de polipropileno de 70 alvéolos con sustrato: suelo ferralítico rojo lixiviado y cachaza (1:3 v/v). *P. chlamydosporia* cepa IMI SD 187 (Bionematicida KlamiC®) se aplicó con *T. asperellum* cepa Ta.13 (Biofungicida SevetriC) mediante inmersión de raíces, previo al trasplante o por aspersión, a los 3 y 20 días posteriores al trasplante. *In vitro*, *T. asperellum* creció más rápido que *P. chlamydosporia*, pero no hubo contacto hifal directo entre ambos hongos. A los 30 días *P. chlamydosporia* colonizó el sistema radical y la rizosfera de las vitroplantas,

cuando se aplicó de forma independiente y en combinación con *T. asperellum* y ambos hongos, promovieron el crecimiento vegetal. Los resultados indicaron que *P. chlamydosporia* y *T. asperellum* son buenos candidatos para estrategias de biomanejo en banano (70).

En el marco del proyecto MUSA, también se obtuvieron avances en el tema de las preformulaciones del ACB, y se realizaron estudios sobre el uso de aceites esenciales, sustancias tenso activas y soportes sólidos (resultados no mostrados) todo lo cual contribuye a un producto de mayor calidad y mayor tiempo de vida en anaquel.

Muchos de estos resultados se incluyeron en algunos libros que tratan sobre el tema de *Pochonia chlamydosporia*, como agente de control biológico de nematodos fitoparásitos

- Hidalgo-Díaz, L. y Kerry, B. R. Integration of biological control with other methods of nematode management. In: Ciancio A, Mukerji KG. (Eds). Integrated Management and Biocontrol of Vegetable and Grain Crops Nematodes. Springer: 2008;29-49.
- Hidalgo-Díaz L, Franco-Navarro F, de Freitas LG. *Pochonia chlamydosporia* Microbial Products to Manage Plant-Parasitic Nematodes: Case Studies from Cuba, Mexico and Brazil. En: Manzanilla-López RH, Lopez-Llorca LV. (eds) Perspectives in Sustainable Nematode Management Through *Pochonia chlamydosporia* Applications for Root and Rhizosphere Health. Springer International Publishing AG. 2017: 311-342. ISBN 978-3-319-59224-4 (eBook), DOI: 10.1007/978-3-319-59224-4.

También, como parte de las investigaciones se originaron un número importantes de Tesis Doctorales:

- Hidalgo-Díaz L. Potencialidades de cepas autóctonas de *Verticillium chlamydosporium* (Goddard) como agente de control biológico de *Meloidogyne* spp. Tesis en Opción al Grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. Santa Clara, Las Villas: Universidad Central de Las Villas Marta Abreu; 2000. 100 págs.
- Montes de Oca N. Buenas Prácticas de Fabricación para la obtención de un bionematicida a partir de la cepa Vcc-108 de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*. Tesis en Opción al Grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. Santa Clara, Las Villas: Universidad Central de Las Villas Marta Abreu; 2004. 152 págs
- García L. Evaluación toxicológica y ecotoxicológica de un bionematicida constituido por la cepa Vcc-108 de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*. Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Veterinarias. UNAH-CENSA, 2005; 118 p.

- Peteira B. Caracterización del hongo nematófago IMI SD 187 *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (Kamyscho ex Barron and Onions) Zare and Gams. Tesis en Opción al Grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. Santa Clara, Las Villas: Universidad Central de Las Villas Marta Abreu; 2006. 118 págs.
- Puertas A. Uso de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (Kamyscho ex Barron y Onions) Zare y Gams como agente de control biológico de *Meloidogyne incognita* (Kofoid yWhite) Chitwood en cultivos hortícolas. Tesis en Opción al Grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. Santa Clara, Las Villas: Universidad Central de Las Villas Marta Abreu; 2007. 126 págs.
- Esteves I. Factors affecting the performance of the fungus *Pochonia chlamydosporia* as a biological control agent for nematodes. Tesis en Opción al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas. Cranfield Health, United Kingdom, 2007
- Arévalo J. Avances en la caracterización de la cepa IMI SD187 de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (Kamyscho ex Barron y Onions) Zare y Gams y mejoras productivas al bionemático Klamic. Tesis en Opción al Grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. Santa Clara, Las Villas: Universidad Central de Las Villas Marta Abreu; 2013. 102 págs.
- Ceiro WG. Aportes a las bases científico-técnicas para el establecimiento de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (Kamyscho 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.

El camino transitado por el equipo de investigación /desarrollo de Klamic®, trazó pautas en estudios de otros ACB en el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria y su divulgación, a través de este artículo, podrá contribuir a otros estudios en el país y la región.

#### AGRADECIMIENTOS

El colectivo de autores agradece a los proyectos internacionales que posibilitaron el financiamiento para la ejecución de varios de los experimentos descritos en este documento: ICA4-CT-2002-10044, MiCoSPA - Microbial Pest Control for Sustainable Peri-Urban/Urban Agriculture in Latin America y Microbial Uptakes for Sustainable management of major banana pests and diseases (MUSA) H2020-SFS-2016-2017, Número de propuesta 727624 (2017-2021). A CNPq y EMBRAPA de Brasil, por su financiamiento a través de becas a investigadores cubanos. También al CITMA y

GEPRO de Cuba, por la oportunidad de ejecutar los proyectos nacionales. A todos los investigadores de diferentes instituciones del Ministerio de Educación Superior (MES) y técnicos que apoyaron en todo momento las investigaciones realizadas. A la Dra. Mayra G. Rodríguez por la revisión cuidadosa y exhaustiva de este artículo.

#### REFERENCIAS

1. Cabrera RI, Latge JP, Domínguez D, González YG. El hongo *Verticillium chlamydosporium*, control biológico de fitonematodos del género *Meloidogyne* en el cultivo de la guayaba. Ciencia y Técnica de la Agricultura, Cítricos y otros Frutales. 1986; 10(4):79-87.
2. Hidalgo-Díaz L. Potencialidades de cepas autóctonas de *Verticillium chlamydosporium* (Goddard) como agente de control biológico de *Meloidogyne* spp. [Tesis en Opción al Grado de Doctor en Ciencias Agrícolas]. Santa Clara, Las Villas: Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas. Cuba; 2000; 100 págs.
3. Rodríguez MG, Rodríguez I, Sánchez L. Especies del género *Meloidogyne* que parasitan el café en Cuba: distribución geográfica y sintomatología. Rev. Protección Veg. 1995; 10: 123-128.
4. Hidalgo L, Sánchez L, Gómez L. *Verticillium chlamydosporium* Goddard, parásito de huevos de *Meloidogyne incognita*. Rev. Protección Veg. 1998; 13(1):29-30
5. Zare R, Gams W. A revision of *Verticillium* sect. Prostrata. IV. The genera *Lecanicillium* and *Stemphicillium* gen. nov. Nova Hedwigia. 2001; 73(1-2):1-50. <https://doi.org/10.1127/nova.hedwigia/73/2001/1>
6. Zare R, Gams W; Evans HC. A revision of *Verticillium* section Prostrata. V. The genus *Pochonia*, with notes on Rotiferophthora. Nova Hedwigia. 2001; 73:51-86. <https://doi.org/10.1127/nova.hedwigia/71/2001/51>
7. Hidalgo-Díaz L, Bourne JM, Kerry BR, Rodríguez MG. Nematophagous *Verticillium* spp. in soils infested with *Meloidogyne* spp. in Cuba: isolation and screening. International Jour. of Pest Management, 2000; 46(4):277-284. <https://doi.org/10.1080/09670870050206046>
8. Gams W. A contribution to the knowledge of nematophagous species of *Verticillium*. Netherlands Jour. of Plant Pathology. 1988; 94:123-148. <https://doi.org/10.1007/BF01978003>
9. Ferreira de Souza J, Martins I, Carneiro RMDG, Hidalgo-Díaz L, Arévalo J, Tigano MS. Fungos isolados de *Meloidogyne mayaguensis* em raízes de goiabeiras infectadas. Circular Técnica 54. Brasília, DF, 2007. 5 págs. ISSN 1516-4349

10. Arévalo J, Hidalgo-Díaz 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* eggs in Brazil. *Tropical Plant Pathology*. 2009; 34(3):158-163. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762009000300004>
11. Arévalo J. Avances en la caracterización de la cepa IMI SD 187 de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (Kamyschko ex Barron y Onions) Zare y Gams y mejoras productivas del bionemático KiamiC®. *Rev. Protección Veg.* 2013; 28(1): 80.
12. Kerry BR, Crump DH, Mullen LA. Studies of the cereal cyst nematodes, *Heterodera avenae*, under continuous cereal, 1975-1978. II. Fungal parasitism of nematode females and eggs. *Annals Applied Biology*. 1982; 100: 489-499. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1982.tb01415.x>
13. Esteves I, Peteira B, Atkins SD, Magan N, Kerry B. Production of extracellular enzymes by different isolates of *Pochonia chlamydosporia*. *Mycological Research*. 2009; 113(8): 867-876. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.04.005>
14. Peteira B, Esteves I, Hidalgo-Díaz L. Detección de proteasas producidas por *Pochonia chlamydosporia* en medio sólido. *Rev. Protección Veg.* 2006; 21(3): 186-190.
15. Peteira B, Esteves I, Montes de Oca N, Hidalgo-Díaz L. Estabilidad de la cepa IMI SD 187 de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* en medio sólido. *Rev. Protección Veg.* 2007; 22 (2): 124-127
16. Peteira B, Estévez I, Atkins S, Hidalgo-Díaz L, Montes de Oca N, Kerry B. Estabilidad de la cepa IMI SD 187 de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (Kamyscho ex Barron y Onions) Zare y W. Gams. Parte II. Indicadores bioquímicos. *Rev. Protección Veg.* 2005; 20(2): 102-109
17. Esteves I, Peteira B, Powers S, Magan N, Kerry B. Effects of osmotic and matric potential on radial growth and accumulation of endogenous reserves in three isolates of *Pochonia chlamydosporia*. *Biocontrol Science and Technology*. 2009; 19(2):185-199. <https://doi.org/10.1080/09583150802650175>
18. Segers R, Butt TM, Kerry BR, Beckett A, Feberdy JF. The role of the proteinase VCP1 produced by the nematophagous *Verticillium chlamydosporium* in the infection process of nematode eggs. *Mycological Research*. 1996; 100:421-428. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(96\)80138-9](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(96)80138-9)
19. Morton CO. Genetic variation in the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* from southern European soil sand molecular characterization of protease VCP1. [PhD Thesis]. University of Nottingham, U.K. 2002. 132 Págs.
20. Morton OC, Hirsch PR, Peberdy JP, Kerry BR. Cloning of and genetic variation in protease VCP1 from the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*. *Mycol. Res.* 2003; 107(1): 38-46. <https://doi.org/10.1017/s0953756202007050>
21. Peteira B, Hidalgo-Díaz. VCP1 protease detection in *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* strain IMI SD 187. *Rev. Protección Veg.* 2009; 24(3): 166-172
22. Atkins SD, Peteira B, Clark IM, Kerry BR, Hirsch PR. Use of real-time quantitative PCR to investigate root and gall colonization by co-inoculated isolates of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*. *Ann Appl Biol.* 2009; 155:143-152. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2009.00333.x>
23. Peteira B, Estévez I, Atkins S, Hidalgo-Díaz L, Kerry B. Inducción de enzimas extracelulares con huevos de *Meloidogyne incognita* y de *Globodera pallida*. *Rev. Protección Veg.* 2009; 24(2): 94-101
24. Atkins SD, Hidalgo-Díaz L, Kalisz H, Mauchline TH, Hirsch PR, Kerry BR. Development of a new management strategy for the control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in organic vegetable production. *Pest Manag Sci.* 2003; 59(2):183-189. <https://doi.org/10.1002/ps.603>
25. Atkins SD, Hidalgo-Díaz L, Clark IM, Morton CO, Montes de Oca N, Gray PA, *et al.* Approaches for monitoring the release of *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*, a biocontrol agent of root-knot nematodes. *Mycol. Res.* 2003; 107 (2): 206-212. <https://doi.org/10.1017/S095375620300724X>
26. Peteira B, Puertas A, Hidalgo-Díaz L, Hirsch P, Kerry B, Atkins S. Real-time PCR to monitor and assess the efficacy of two types of inoculum of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* against root-knot nematode populations in the field. *Biotecnología Aplicada*. 2005; 22:261-266
27. EPA. Prevention, Pesticides and Toxic Substances. Series 885-Microbial Pesticide Test Guidelines; 1996.
28. OECD. Environment Monograph No.106. Data requirements for registration of biopesticides in OECD member countries: survey results. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development; 1996.
29. Gaceta Oficial de la República de Cuba, Ministerio de Justicia: Resolución Conjunta del MINSAP y MINAGRI. No 16: 77-84 (16 de abril del 2007).

30. García L, Bulnes C, Melchor G, Vega E, Montes de Oca N, Hidalgo-Díaz L, *et al.* Safety of *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* in acute oral and dermal toxicity/pathogenicity evaluations in rats and rabbits. *Veterinary and Human Toxicology*. 2004; 46(5):248-250. PMID: 15487645
31. García L, Bulnes C, Melchor G, Hidalgo-Díaz L, Figueredo J, Vega E, *et al.* Safety of *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* in quails. *Revista de Salud Animal*. 2009; 31(1):40-45.
32. García L, Melchor G, Montes de Oca N, Hidalgo-Díaz L. Estudio de la irritación ocular y dérmica de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*. *Revista Toxicología. España*. 2004; 21(3):103-107.
33. García L, Melchor G, Domínguez Y, Rodríguez H, Pino O, Hidalgo-Díaz L. Ecotoxicological evaluation of *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* in terrestrial invertebrates. *RETEL (Revista de Toxicología en Línea)*; 2008, No.14. Disponible en: <https://www.sertox.com.ar/modules.php>
34. García L, Melchor G, Arévalo J, Hidalgo-Díaz L. Evaluación de la fitotoxicidad de la cepa IMI SD187 de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* sobre *Zea mays* L. y *Phaseolus vulgaris* L. *Rev. Protección Veg.* 2008; 23(1): 38-43
35. Villoch A, Montes de Oca N, Hidalgo L, Alemán J. Sistema de gestión de la calidad. Su utilidad en la Industria de biocontrol. *Rev. Protección Veg.* 2003; 18(2): 85-91.
36. Villoch A, Montes de Oca N, Hidalgo L. Elaboración de una guía de buenas prácticas para la producción de biocontroles. *Rev. Protección Veg.* 2003; 18 (2): 92-99.
37. Montes de Oca N, Arévalo J, Acosta N, Hidalgo L. Herramientas para el control de la calidad de la cepa IMI SD 187 de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (Kamyscho ex Barron y Onions) Zare y W. Gams. *Rev. Protección Veg.* 2005; 20(2): 86-92.
38. Montes de Oca N, Arévalo J, Acosta N, Peteira B, Hidalgo-Díaz L, Kerry B. Estabilidad de la cepa IMI SD 187 de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (Kamyscho ex Barron y Onions) Zare y W. Gams. Parte I. Indicadores morfológicos, productivos y patogénicos. *Rev. Protección Veg.* 2005; 20(2): 93-101
39. Montes de Oca N. Buenas prácticas de fabricación para la obtención de un bionematicida a partir de la cepa Vcc 108 de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*". [Tesis en opción al grado de Doctores en Ciencias Agrícolas]. UNAH-CENSA. Cuba; 2004. 152 págs.
40. Montes de Oca N, Arévalos J, Nuñez A, Riverón Y, Villoch A, Hidalgo-Díaz L. Klamic: experiencia técnica-productiva. *Rev. Protección Veg.* 2009; 24(1): 62-65
41. Hidalgo Díaz L. Investigación, desarrollo e innovación de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* como agente microbiano para el control de nematodos formadores de agallas. *Rev. Protección Veg.* 2013; 28(3): 238.
42. Miranda I, Arévalo J, Hidalgo-Díaz L. Metodología de superficie respuesta para evaluar estabilidad en almacén de un agente de control biológico. *Rev. Protección Veg.* 2013; 28(3):224-228.
43. Kerry B, Hidalgo-Díaz. Application of *Pochonia chlamydosporia* in the integrated control of root-knot nematodes on organically grown vegetable crops in Cuba. *Multitrophic Interactions in the Integrated Control IOBC WPRS Bulletin* 2004; 27(1): 123-126.
44. 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.
45. Puertas A, Hidalgo-Díaz L. Efecto del momento de aplicación de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* sobre su eficacia en el control de *Meloidogyne incognita*. *Rev. Protección Veg.* 2009; 24(3): 177-179.
46. Puertas A, Hidalgo-Díaz L. Efecto de diferentes abonos orgánicos sobre el establecimiento de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* en el sustrato y la rizosfera de plantas de tomate. *Rev. Protección Veg.* 2009; 24 (3): 162-165.
47. Arévalo J, Silva SD, Carneiro MDG, Lopes RB, Carneiro RMDG, Tigano MS, *et al.* Efecto de la presencia de abono orgánico sobre la actividad de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (Kamyschko ex Barron y Onions) Zare y Gams frente a *Meloidogyne enterolobii* Yang y Eisenback. *Rev. Protección Veg.* Vol. 2012; 27(3): 167-173
48. Charles NJI, Arévalo J, Hernández A, Alonso NJ, Hidalgo-Díaz L. Effects of mineral, organic, and biological fertilization on the establishment of *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (Kamyschko ex. Barron and Onions) Zare & Gams in a protected crop. *Rev. Protección Veg.* 2015; 30(3):239-244.
49. Puertas A, de la Noval BM, Martínez B, Miranda I, Fernández F, Hidalgo-Díaz L. Interacción de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* con *Rhizobium* sp., *Trichoderma harzianum* y *Glomus clarum* en el control de *Meloidogyne incognita*. *Rev. Protección Veg.* 2006; 21(2): 80-89

50. Puertas A, Hidalgo-Díaz L. Influencia de la planta hospedante y su interacción con *Meloidogyne incognita* sobre la efectividad de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*. Rev. Protección Veg. 2007; 22(2): 104-109
51. Kerry BR. Exploitation of the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* Goddard for the biological control of Root-knot Nematodes (*Meloidogyne* spp.) En: Magan N, Butt TM, Jackson C (Eds.). Fungi as Biocontrol Agents. 2001. CABI International, Wallingford, Oxon (CABI). Chapter 5: 155-167. <http://dx.doi.org/10.1079/9780851993560.0155>
52. Rodríguez A. La agricultura Urbana en Cuba. Impactos económicos, sociales y productivos. Revista Bimestre Cubana. 2004; XCV (20):115-137.
53. Rodríguez MG, Sánchez L, Gómez L, Hidalgo L, González E, Gómez M, et al. *Meloidogyne* spp., plagas de las hortalizas: alternativas para su manejo en sistemas de cultivo protegido. Rev. Protección Veg. 2005, 20(1): 1-10.
54. Carneiro RMDG, Hidalgo-Díaz L, Martins I, Ayres de Souza KFS, Guimarães de Sousa M, Tigano MS. Effect of nematophagous fungi on reproduction of *Meloidogyne enterolobii* on guava (*Psidium guajava*) plants. Nematology. 2011; 13(6): 721-728. <http://dx.doi.org/10.1163/138855410X545777>
55. Arévalo J, Silva SD, Carneiro MDG, Lopes RB, Carneiro RMDG, Tigano MS, et al. *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare y Gams como potencial agente de control biológico de *Meloidogyne enterolobii* (Yang y Eisenback) en cultivos hortícolas. Rev. Protección Veg. 2012; 27(2):123-129.
56. Puertas A. Uso de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (Kamyscho ex Barron y Onions) Zare y Gams como agente de control biológico de *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood en cultivos hortícolas. [Tesis en Opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas]. Universidad Agraria de la Habana, Mayabeque, Cuba. 2007. 126 págs
57. Peteira B. Caracterización del hongo nematófago *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (Kamyscho ex Barron and Onions) Zare y Gams IMI SD 187. [Tesis en Opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas]. Universidad Agraria de la Habana, Mayabeque, Cuba. 2005. 118 págs
58. Atkins SD, Peteira B, Clark IM, Kerry BR, Hirsch PR. Use of real-time quantitative PCR to investigate root and gall colonisation by co-inoculated isolates of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*. Ann Appl Biol. 2009; 155: 143-152. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2009.00333.x>
59. Hidalgo-Díaz L. Investigación, desarrollo e innovación de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*: Agente de control microbiano de nematodos formadores de agallas. [Tesis en Opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias]. Universidad Agraria de la Habana, Mayabeque, Cuba. 2013. 56 págs
60. Mena J, Pimental E, Veloz L, Hernández AT, León L, Ramírez Y, et al. Aislamiento y determinación de cepas bacterianas con actividad nematocida. Mecanismo de acción de *C. paurometabolum* C-924 sobre nematodos. Biotecnología Aplicada. 2003; 20(4):248-252.
61. Mena J. Manual de aplicación del bionematocida HeberNem-L. Camagüey, Cuba: CIGB; 2007.
62. Ceiro WG, Arévalo J, Puertas A, Hidalgo-Díaz L. Tolerancia de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (Kamyschko ex Barron y Onions) Zare y W. Gams a diferentes niveles de cloruro de sodio. Rev. Protección Veg. 2013; 28(3): 70-73.
63. Ceiro WG, Arévalo J, Puertas A, Hidalgo-Díaz L. Efecto de concentraciones de NaCl sobre el crecimiento micelial y la esporulación de *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare y Gams en medio PDA y suelo. Rev. Protección Veg. 2014; 29(2): 122-127.
64. Hidalgo-Díaz L, Ceiro WG. Interacción entre *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (Kamyschko ex Barron y Onions) Zare y Gams y *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood en tomate en presencia de NaCl. Rev. Protección Veg. 2017; 32(1): 76-81.
65. Ceiro-Catasú WG, Hidalgo-Viltres M, Hidalgo-Díaz L, Arévalo-Ortega J, García-Bernal M, Mazón-Suástegui JM. Establecimiento *in vitro* del hongo nematófago *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* en diferentes suelos. Terra Latinoamericana 39:1-7. e792. <https://doi.org/10.28940/terra.v39i0.7922021>
66. Ceiro WG, Arévalo J, Hidalgo-Díaz L. Efectos de plaguicidas y bioestimulantes vegetales sobre la germinación de clamidosporas y el desarrollo *in vitro* del hongo nematófago *Pochonia chlamydosporia*. Rev Iberoam Micol. 2015; 32(4):277-280. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2014.07.008>
67. Ceiro W, Puertas A, Arévalo J, Hidalgo-Díaz L. Efectos de la aplicación de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* Kamyscho ex Barron y Onions (Zare y Gams) sobre el desarrollo de plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Rev. Protección Veg. 2011; 26(2): 118-121
68. Arévalo J, Hernández MÁ, Lamz A, Montes de Oca N, Hidalgo-Díaz L. Efecto de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (Goddard) Zare

- y Gams como endófito facultativo en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Rev. Protección Veg. 2019; 34(2): 1-10
69. Hernández MA, Arévalo J, Marrero D, Hidalgo-Díaz L. Efecto de KlamiC® en la estimulación del crecimiento de vitroplantas de plátanos y bananos. Cultivos Tropicales. 2016; 37(4): 168-172
70. Arévalo Ortega J, Martínez Cocai B, Hernández Socorro MA, Alfonso de la Cruz R, Ynfante Martínez D, Hidalgo-Díaz L. Efecto de la aplicación conjunta de *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare y Gams y *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt y Nirenberg en vitroplantas de banano (*Musa* sp.). Rev. Protección Veg. 2021; 36(1): 1-10

**Conflicto de intereses:** Los autores no poseen conflicto de intereses

**Contribución de los autores:** Belkis Peteira Delgado: **Conceptualización, Curación de datos, Investigación, Escritura - borrador original, Redacción: revisión y edición.** Jersys Arevalo: **Revisión Borrador original.** Leopoldo Hidalgo: **Revisión Borrador original**

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/)