

NOTA TÉCNICA

## Efecto *in vitro* de concentraciones del NEMACID® sobre huevos y juveniles de *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood

Yusmila Guevara<sup>I</sup>, Eulalia Gómez<sup>I</sup>, Oriela Pino<sup>II</sup>, Y. Rodríguez<sup>I</sup>, Ileana Miranda<sup>II</sup>, R. Enrique<sup>II</sup>,  
Mayra G. Rodríguez<sup>II</sup>

<sup>I</sup>Dirección de Bioprocesos CUBA-10 del Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA). Pablo Noriega, Quivicán. Mayabeque. Cuba. Correo electrónico: [cuba10@enet.cu](mailto:cuba10@enet.cu). <sup>II</sup>Grupo de Plagas Agrícolas. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Apartado 10, San José de las Lajas. Mayabeque. Cuba

**RESUMEN:** Para el manejo de nematodos, se desarrolló en Cuba el producto NEMACID®, que posee como ingrediente activo metabolitos obtenidos a partir de los efluentes de la fermentación líquida de *Lecanicillium lecanii* (Zare & Gams) formulado con sulfato de amonio. El objetivo de este ensayo fue determinar el efecto del NEMACID® sobre los huevos y juveniles ( $J_2$ ) de *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood. En el ensayo se utilizaron como controles agua destilada, sulfato de amonio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 1,69 mg.ml<sup>-1</sup>) y Dazomet (1g.1000ml<sup>-1</sup>); y se evaluaron cinco concentraciones de NEMACID® (18,75; 3,75; 1,875; 0,1875 y 0,01875mg.ml<sup>-1</sup>). Los valores de  $\text{LC}_{50}$  y  $\text{LC}_{90}$ , se calcularon usando el método Probit. Las evaluaciones se llevaron a cabo a las 24 horas, contabilizándose el número de  $J_2$  inmóviles y huevos no eclosionados del total. Los resultados corroboraron la acción nematocida del producto que provocó el colapso del contenido interno de los juveniles y resultó imposible su recuperación posterior. El NEMACID® a la concentración de 18,75 mg.ml<sup>-1</sup> produjo mayor efectividad sobre la eclosión de los huevos y mortalidad de los juveniles que el Dazomet (control). El sulfato de amonio, producto que acompaña al hongo en el proceso de fermentación y forma parte de la formulación final del NEMACID®, no produjo afectación a huevos y juveniles. Las concentraciones de NEMACID® de 3,75 mg.ml<sup>-1</sup> e inferiores no resultaron satisfactorias en el tratamiento de los huevos, donde el porcentaje de inhibición de la eclosión de los mismos estuvo por debajo del 50. Mientras que en juveniles, la concentración de 3,75 mg.ml<sup>-1</sup> del producto ocasionó mortalidad por encima del 70%, sin diferencia significativa con el producto Dazomet.

**Palabras clave:** control biológico, nematodos agalleros, *Lecanicillium lecanii*.

---

### *In vitro* effect of different concentrations of NEMACID® on eggs and juveniles of *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood

**ABSTRACT:** NEMACID® was developed in Cuba for root knot nematode management. This product contains the effluents from liquid fermentation of *Lecanicillium lecanii* (Zare and Gams) as active ingredient, and is formulated with ammonium sulfate. The objective of this test was to determine the effect of NEMACID® on eggs and juveniles ( $J_2$ ) of *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood. In the test, five concentrations of NEMACID® (18,75; 3,75; 1,875; 0,1875 y 0,01875mg.ml<sup>-1</sup>) were evaluated using distilled water, ammonium sulfate ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 1,69mg.ml<sup>-1</sup>) and Dazomet (1g.1000ml<sup>-1</sup>) as controls. The  $\text{CL}_{50}$  and  $\text{CL}_{90}$  were calculated using Probit analysis. The evaluations were done at 24h, when the total number of non mobile juveniles and non hatched eggs from the total were counted. The result corroborated the nematocidal action of the product by producing the collapse of the internal content in juveniles with an impossible recovery. NEMACID® at a concentration of 18,75 mg. ml<sup>-1</sup> showed a higher effect on egg hatching and juvenile mortality than Dazomet (control). The ammonium sulfate, a product accompanying the fungus in the fermentation process as part of the final formulation of NEMACID®, did not affect eggs or juveniles. Concentrations of NEMACID® equal to 3,75mg.ml<sup>-1</sup> or lower did not affect the eggs, with a percentage of hatching inhibition below 50%. Meanwhile, in juveniles, the concentration of 3.75mg.ml<sup>-1</sup> caused a mortality over 70%, without significant differences with Dazomet.

**Key words:** biological control, root-knot nematodes, *Lecanicillium lecanii*.

---

Por las características socio-productivas, tecnológicas, ecológicas y las especies botánicas utilizadas, los sistemas de producción protegida de hortalizas son muy vulnerables en Cuba a los nematodos formadores de agallas (*Meloidogyne* spp.) (1). El manejo de esta plaga es complejo, debido a factores como, la polifagia de las especies principales, sus cortos ciclos de vida que conllevan a la existencia de varias generaciones al año, la virulencia de algunas poblaciones, altas tasas de reproducción y existencia de mecanismos de supervivencia, entre otros atributos (2).

En las últimas décadas, diversos grupos de investigación desarrollaron en Cuba varias tácticas para el manejo de poblaciones de *Meloidogyne* spp. entre las que se destacan el uso de biodesinfección, plantas trampas, injerto herbáceo y agentes de control biológico, entre otras (1).

Esos estudios propiciaron que se cuente en la actualidad con efectivos bionematicidas que se producen a escala comercial o están en desarrollo (3). Entre ellos se cuenta con el producto NEMACID® desarrollado por el Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA), a partir de efluentes de la fermentación de *Lecanicillium lecanii* (Zare & Gams) (4).

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto *in vitro* de diferentes dosis de NEMACID® sobre la eclosión de huevos y supervivencia de juveniles infestivos de *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood, para estimar la menor dosis factible del producto que será empleada en estudios posteriores.

Para ello se utilizaron huevos y juveniles de segundo estadio (J<sub>2</sub>) de una población de *M. incognita* raza 2, identificada y caracterizada morfológica, fisiológica y molecularmente (5) y conservada en los aisladores biológicos del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), en hospedantes (*Solanum lycopersicum* L. cultivar Campbell 28). La extracción de los huevos y juveniles se hizo con hipoclorito de sodio (6).

El lote de NEMACID evaluado fue el Número 4/07 producido en un fermentador de 500L<sup>-1</sup> a partir de efluentes de la fermentación de la cepa No. 3166 de *L. lecanii*. Para la evaluación del producto NEMACID®, se emplearon como controles negativos agua destilada y Sulfato de Amonio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 1,69 mg.ml<sup>-1</sup>), este último producto acompaña el proceso de fermentación y está presente en el producto formulado. Como control positivo se empleó Dazomet (1g.1000ml<sup>-1</sup>; 3,5 dimetiltetrahidro-2-tio-2H 1.3.5 tiadiazin), dosis equivalente a 400kg.ha<sup>-1</sup>(dosis que se emplea en la producción). El NEMACID® se empleó a una concentra-

ción inicial de 37,5mg.ml<sup>-1</sup>, equivalente a la dosis de 30kg.ha<sup>-1</sup> (solución final de 800L en agua).

Para los ensayos se emplearon placas plásticas de 24 pocillos, donde se situaron los huevos o juveniles utilizando 4 réplicas (pocillos) por tratamiento. Cada pocillo contenía 100µl de agua destilada con los huevos o juveniles, 900µl de agua destilada y 1000µl de la solución muestra. Las evaluaciones se realizaron a las 24h. Se contabilizó el número total de huevos o juveniles y de ellos los afectados. En el caso de los juveniles inmóviles se transfirieron a vidrios reloj con agua unas dos horas y luego se montaron en portaobjetos y se observaron en microscopio óptico con 400 y 1000 aumentos, para ratificar si estaban muertos.

Los valores de LC<sub>50</sub> y LC<sub>90</sub> se calcularon usando el método Probit, programa Polo (LeOra Software, Berkely, California). Los datos de eficacia y mortalidad se compararon a través de una Comparación Múltiple de Proporciones utilizando el software CompaProWin 2.0.

El NEMACID® (18,75 mg.ml<sup>-1</sup>) produjo los mayores valores de eficacia sobre huevos y mortalidad en juveniles de *M. incognita* sin diferir estadísticamente de los exhibidos en el testigo positivo (Dazomet- 0,01 mg.ml<sup>-1</sup>). Se produjeron diferencias significativas entre los tratamientos de NEMACID®; el sulfato de amonio no produjo efecto sobre juveniles y huevos, por lo que se puede atribuir la mortalidad de los juveniles y la no eclosión de los huevos al ingrediente activo del NEMACID® (Tabla 1).

Las concentraciones de 3,75 mg.ml<sup>-1</sup> de NEMACID® e inferiores no resultaron satisfactorias en el tratamiento de los huevos, donde el porcentaje de inhibición de la eclosión de los mismos estuvo por debajo del 50. Mientras que en juveniles, la concentración de 3,75 mg.ml<sup>-1</sup> del producto ocasionó mortalidad por encima del 70%, valor que resulta satisfactorio.

En los huevos tratados con las diferentes concentraciones NEMACID®, se pudo constatar que la capa exterior de éstos colapsó, efecto que pudo estar relacionado con la presencia de metabolitos y enzimas (enzimas proteolíticas y lipolíticas) (7) en el producto provenientes del hongo *L. lecanii*.

Los juveniles muertos mostraron desorden de los órganos internos y se observaron vacuolas y zonas oscuras. La organización interna no mostró recuperación posterior, luego que los juveniles fueran transferidos a agua y resultó evidente su muerte por la rigidez que mostraron. Estos resultados corroboraron la acción nematicida que fue atribuida al producto (8).

**TABLA 1.** Efecto de concentraciones de NEMACID® sobre la eclosión de los huevos y mortalidad en juveniles./ *Effects of NEMACID® concentrations on egg hatching and juvenile mortality.*

Variante Experimental (mg.ml <sup>-1</sup> )	Huevos			Juveniles de segundo estadio		
	Total	no eclosionados	Eficacia (24h) (%)	Total	Muertos	Mortalidad (24 h) (%)
Dazomet (0,01)	20	17	85a	50	40	80ab
NEMACID® (18,75)	22	20	90a	52	49	94a
NEMACID® (3,75)	23	10	43b	53	40	75b
NEMACID® (1,875)	20	3	15c	50	15	30c
NEMACID® (0,1875)	21	2	9c	50	5	10d
NEMACID® (0,01875)	23	1	4c	52	2	4d
Control(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0,168)	22	0	0c	50	0	0d
Control H <sub>2</sub> O	20	0	0c	50	0	0d
ESx	0,163			0,171		

Letras desiguales en la misma columna indican diferencia significativa ( $p < 0,05$ ).

Con relación a la concentración media letal (LC<sub>50</sub>) el valor medio fue de 1,94 mg.ml<sup>-1</sup> con un intervalo de confianza de 1,22 – 3,12 mg.ml<sup>-1</sup> y la concentración letal 90 (LC<sub>90</sub>) el valor medio fue de 26,41 mg.ml<sup>-1</sup> con un intervalo de confianza entre 13,37 – 76,49 mg.ml<sup>-1</sup>, respectivamente. Dichos valores permitieron determinar la dosis adecuada para los experimentos en condiciones semicontroladas y de campo, la cual deberá ser de 30kg.ha<sup>-1</sup>, para obtener resultados favorables en el manejo de poblaciones de *M. incognita*.

## REFERENCIAS

- Rodríguez MG, Gómez L, Hernández-Ochandía D, Peteira B, Díaz-Viruliche L, González FM, *et al.* *Meloidogyne* spp. como plagas de las hortalizas en sistemas de producción protegida: Principales especies y alternativas para su manejo. Conferencia. Curso de Cultivos Protegidos. En 1<sup>er</sup> Congreso Cubano de Horticultura. 23-25 Noviembre 2012. La Habana. Cuba. 20pp. (CD Editora Liliana, Cuba).
- Moens M, Perry RN, Starr JL. *Meloidogyne* Species - a Diverse Group of Novel and Important Plant Parasites. Pp. 1-17 In Root-knot Nematodes. Moens M, RN Perry, JL Starr (Eds.). CAB International. 2009.
- Fernández-Larrea O, Peña Y, Baró Y, Coll Y, Dibut B, Díaz de Villegas ME, *et al.* Desarrollo de los bioproductos agrícolas en Cuba. En Memorias del 2<sup>do</sup> Congreso Internacional LABIOFAM. La Habana, 24-28 de septiembre 2012.
- Gómez E. Nematicida a partir de los efluentes de la fermentación del hongo *Verticillium lecanii*. Oficina Cubana de Propiedad Intelectual (OCPI). No. 2002-0312. Boletín Oficial de la OCPI. 2003; Año CII. No 179: 20.
- Gómez L. Diagnóstico de nematodos agalleros y prácticas agronómicas para el manejo de *Meloidogyne incognita* en la Producción Protegida de Hortalizas. [Tesis en opción al grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas]. 2007. Universidad Agraria de la Habana, Cuba. 100pp.
- Hussey RS, Barker KB. A comparison of methods for collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. Plant Disease Report. 1973; 57:1025-1028.
- Gómez E, Álvarez RM, Fraga R, Reyes I, Hernández J, Lemes T, San Juan AN. Metabolitos producidos por el hongo entomopatógeno *Verticillium lecanii*. Biotecnología Aplicada (Cuba).2004;21(2):92-95.
- Gómez E. Nematicida a partir del hongo *Verticillium lecanii*. Revista Terralia (España). 2001;24:30.

Recibido: 20-7-2012.  
Aceptado: 19-12-2012.