

EVALUACIÓN DE LA FITOTOXICIDAD DE LA CEPA IMI SD 187 DE *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* SOBRE *Zea mays* L. Y *Phaseolus vulgaris* L.

Liseth García*, Gleybi Melchor*, Jersys Arévalos** y L. Hidalgo-Díaz**

*Grupo Farmacología-Toxicología, Dirección de Salud y Producción Animal y **Grupo Plagas Agrícolas, Dirección de Protección de Plantas. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, La Habana, Cuba. Correo electrónico: lhidalgo@censa.edu.cu

RESUMEN: Las evaluaciones de fitotoxicidad en plantas terrestres no-diana de los plaguicidas utilizados en la agricultura requieren un adecuado número de ensayos en diferentes especies. En este estudio se evaluó el efecto de un hongo nematófago, sobre la germinación, el crecimiento y la sobrevivencia de dos especies de plantas de importancia económica: maíz (clase monocotiledónea) y fríjol (clase dicotiledónea). También se determinó la concentración del hongo en los tallos, hojas y raíces. Los resultados mostraron que la aplicación del hongo no afectó la germinación ni el crecimiento de las plantas. El análisis de la concentración tisular indicó que el hongo no se acumuló en las partes aéreas de las plantas y tuvo un crecimiento endófito en las raíces sin producir toxicidad en estas dos plantas no-diana.

(Palabras clave: plantas terrestres; fitotoxicidad; plaguicidas microbianos; *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*)

PHYTOTOXICITY TESTING OF THE STRAIN IMI SD 187 OF *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* ON *Zea mays* L. AND *Phaseolus vulgaris* L.

ABSTRACT: Assessment of pesticide phytotoxicity on nontargeted plants requires an appropriate number of data from multiple species. In this study, the effect of a new microbial agent developed to control of root-knot and cyst nematodes was determined on germination, growth and plant survival of two valuable economic crops species: maize (class monocotyledon) and bean (class dicotyledon). Concentrations of the fungus in stems, leaves and roots were also measured. The results showed that plant germination and growth were not affected by the fungus application. Analysis of tissue concentrations indicated that the fungus did not accumulate in the aerial parts of the plants showing an endophytic growth in the roots with no toxicity effect on plants.

(Key words: terrestrial plants; phytotoxicity; microbial pesticides; *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*)

INTRODUCCIÓN

Las plantas terrestres son un componente vital del ecosistema y el efecto de sustancias tóxicas sobre ellas puede provocar cambios en la diversidad de las especies, la dinámica poblacional y la estructura de la comunidad (1).

Los ensayos de toxicidad que se realizan siguiendo las guías internacionales brindan información rela-

cionada con el efecto de los compuestos evaluados sobre el establecimiento y mantenimiento de comunidades de plantas terrestres. Los procedimientos para evaluar los efectos tóxicos sobre las plantas comienzan desde la evaluación de respuestas fisiológicas en estudios a corto plazo hasta la evaluación en campo (3).

Estudios realizados por Hidalgo-Díaz (6) y Kerry e Hidalgo-Díaz (8) han demostrado las potencialidades de la cepa IMI SD 187 del hongo *Pochonia chlamydosporia*

var. *catenulata* (Kamyscho ex Barron y Onions) Zare y W. Gams en el control de nematodos del género *Meloidogyne* y por tanto proponen su inclusión en programas de manejo integrado de plagas.

La seguridad de esta cepa se ha evaluado a diferentes niveles: en estudios agudos por vía oral y dérmica no produce toxicidad, infectividad ni patogenicidad en ratas y conejos (4); clasificada como no irritante ocular y no irritante dérmico (5). Como parte de los estudios de seguridad el objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto ecológico del hongo, a través de la evaluación de la fitotoxicidad en dos especies de plantas terrestres no-diana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la ejecución del ensayo de fitotoxicidad se utilizó inóculo fungoso de la cepa IMI SD 187 de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*, reproducida según el protocolo descrito por Montes de Oca (11) en la Unidad de Desarrollo de Hongos Agentes de Control Biológico del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Los tipos de inóculos empleados fueron: sustrato colonizado con el hongo (Producto Final-PF) y polvo de clamidosporas puras del hongo (Principio Activo-PA). Para ajustar la concentración de clamidosporas en el sustrato colonizado, a 1 g de sustrato se le adicionaron 9mL de agua destilada estéril. La mezcla se agitó vigorosamente para desprender las clamidosporas y se procedió al conteo en un hematocitómetro. Para la variante de clamidosporas puras (PA), estas fueron extraídas del sustrato colonizado después de 21 días de incubación a 25°C, utilizando un MycoHarvester (CABI, Bioscience-Biopesticides Programme) y su concentración fue determinada de igual forma que el inóculo anterior.

La fitotoxicidad producida por los dos tipos de inóculo se determinó sobre la base de los efectos sobre la germinación de las semillas, crecimiento y sobrevivencia de las plantas, según establecen los protocolos de la OECD (Protocolo 208) y de la EPA (OPPTS 885.4300), órganos reguladores de la Unión Europea y los Estados Americanos del Norte, respectivamente (3,12).

Las especies utilizadas fueron maíz (*Zea mays* L.), clase monocotiledónea, representativa del grupo de plantas tropicales llamadas cereales de grano y frijol negro (*Phaseolus vulgaris* L.) y clase dicotiledónea, representativa del grupo de leguminosas de grano.

Se conformaron cuatro tratamientos por cada cultivo: I- control sin inoculación del hongo; II- control inoculado con 1g del principio activo inactivado a

121°C durante 30 minutos (PAI); III- inoculado con 1g de PA a una concentración de $1,1 \times 10^8$ clamidosporas/kg de suelo y IV- inoculado con 1g del PF a una concentración de 10^7 clamidosporas/kg de sustrato. Las sustancias de ensayo se mezclaron con el sustrato conformado por una mezcla de suelo ferralítico rojo subtipo compactado + materia orgánica (estiércol vacuno) en proporción 1:1, en una maceta de 1 kg. Una hora después se sembraron tres semillas en cada maceta, para un total de seis macetas por tratamiento. Las macetas fueron distribuidas en un diseño de bloques al azar en un aislador biológico con condiciones controladas de temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) y humedad (75%) por 21 días.

Los parámetros finales evaluados fueron: peso fresco de raíz, tallo y hojas; el número de semillas germinadas por grupo, el por ciento de daño visual en las plantas basado en la observación de signos de fitotoxicidad tales como clorosis, rayas amarillas intervenales, deformación de la raíz, deformaciones foliares, atrofia o lento crecimiento, color púrpura en tallo y/o hojas, inclinación del tallo, hojas cerradas y necrosis.

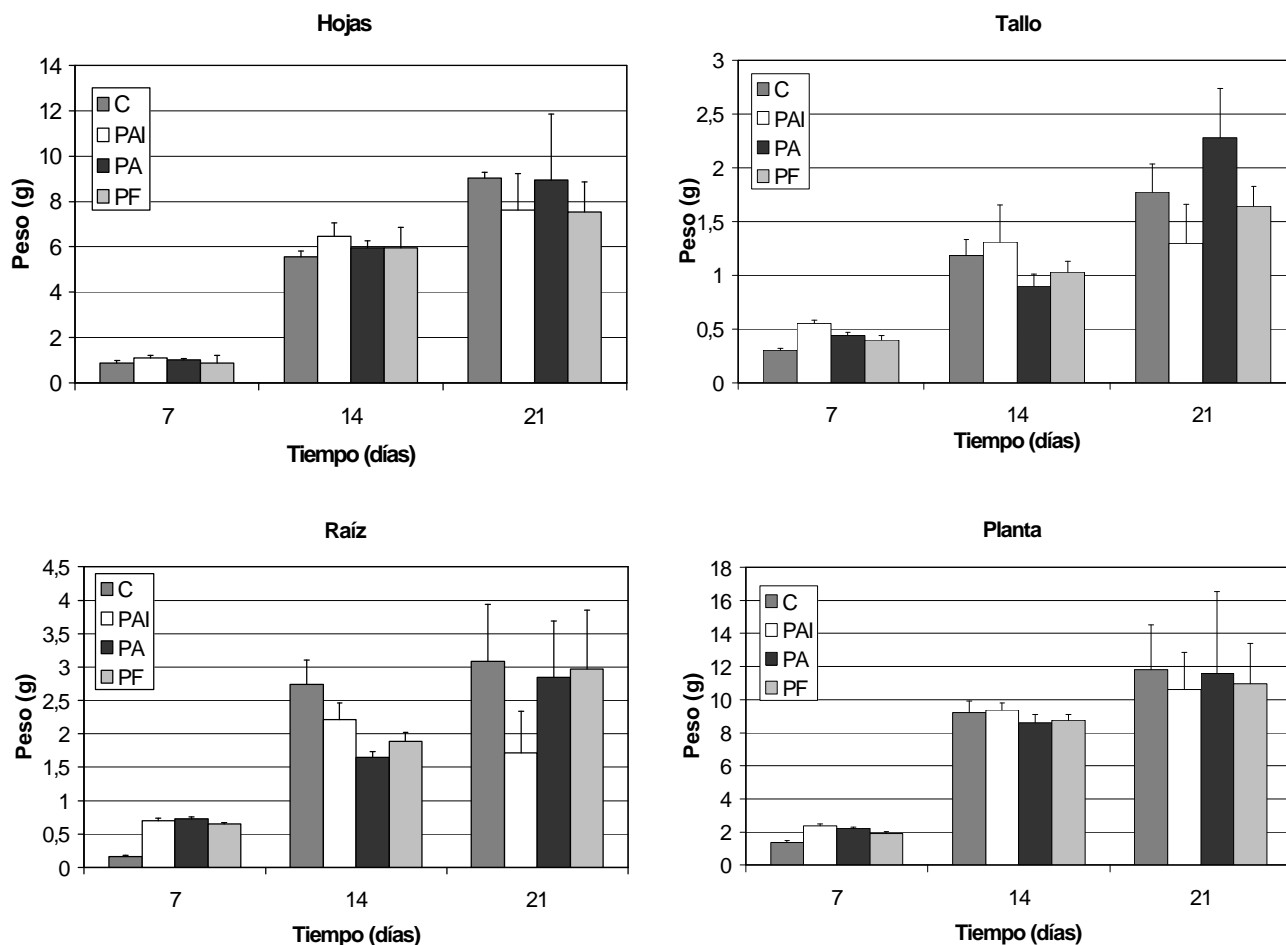
Además, se realizó análisis cuantitativo del establecimiento del hongo en el suelo, raíces y partes aéreas de la planta según la metodología descrita por Kerry y Bourne (7). El día 0 se cuantificó las UFC/g de suelo y en los días 7, 14 y 21 además del suelo, se determinó este parámetro en raíz, tallo y hojas de dos plantas por cada grupo.

El peso de las partes de las plantas tratadas se compararon estadísticamente con los controles mediante un análisis no paramétrico (prueba de Kruskal Wallis), con un nivel de significación del 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con relación al estudio en plantas, las especies evaluadas son de gran utilización en el país en la alimentación animal y humana, de gran importancia económica y ecológica y recomendadas por regulaciones internacionales para estudios de toxicidad aguda en plantas terrestres no-diana (12). En los grupos tratados no se observó ningún efecto tóxico del hongo sobre la germinación y emergencia de las semillas, ya que se obtuvo un 100% de germinación en todos los casos y no se observaron efectos tóxicos.

Al comparar los pesos, de las plantas completas y de raíz, tallo y hojas por separado de las tratadas con respecto a los controles, no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las plantas evaluadas (Figura 1 y 2).



Valores como media±DS

n=6

Leyenda: C: control

PAI: principio activo inactivado

PA: principio activo

PF: producto final

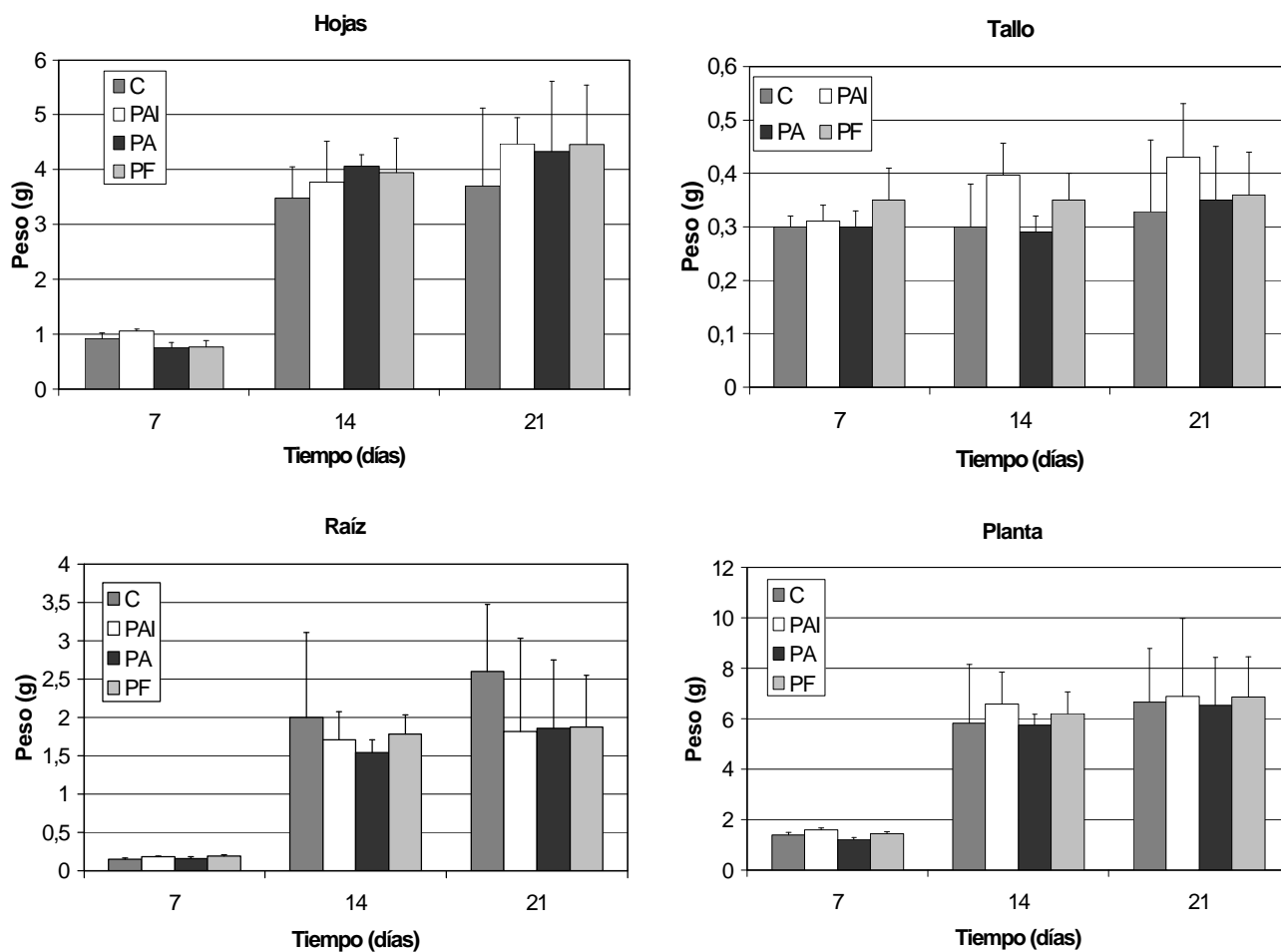
FIGURA 1. Comportamiento del peso fresco de plantas de *Zea mays* tratado con la cepa IMI SD 187 de *P. chlamydosporia* var. *catenulata*./ Behaviour of *Zea mays* fresh weight treated with the strain IMI SD 187 of *P. chlamydosporia* var. *catenulata*.

Como se puede apreciar en la Tabla 1, no se detectó la presencia del hongo en ninguna de las partes aéreas de las plantas analizadas y los niveles detectados en raíces están en el mismo orden que los encontrados por Kerry *et al.* (9) y Peteira *et al.* (13). En el suelo se corroboró la presencia del hongo durante todo el estudio, con un comportamiento similar al que informan Peteira *et al.* (13). Estos resultados coinciden con Bordallo *et al.* (2) los cuales demostraron que los hongos nematófagos colonizan endofíticamente las raíces de las plantas mono y dicotiledóneas induciendo modificaciones en la pared celular que no inhiben el crecimiento de las mismas y sugieren para estos hongos un efecto de control indirecto que modula la respuesta de defensa del hospedante. Así mis-

mo, López-Llorca *et al.* (10) encontraron que las hifas de *P. chlamydosporia* penetran las células epidérmicas de las raíces, a menudo, por medio de apresorios, pero las células corticales son el límite para la colonización del hongo y plantean que no se han encontrado hifas en el cilindro vascular de las mismas.

Con estos resultados se demuestra que el hongo no es fitotóxico a *Z. mays* y *P. vulgaris* y que no se transloca hacia las partes aéreas de las plantas, por lo que no tendrá posibilidad de entrar en la cadena alimentaria de vertebrados fitófagos.

No obstante, se recomienda extender estos estudios a otras especies de plantas terrestres según lo establecido en las guías de la EPA (3).



Valores como media±DS

n=6

Leyenda: C: control

PAI: principio activo inactivado

PA: principio activo

PF: producto final

FIGURA 2. Comportamiento del peso fresco de plantas de *Phaseolus vulgaris* tratadas con la cepa IMI SD 187 *P. chlamydosporia* var. *catenulata*. / Behaviour of *Phaseolus vulgaris* fresh weight treated with the strain IMI SD 187 of *P. chlamydosporia* var. *catenulata*.

TABLA 1. Presencia de la cepa IMI SD 187 de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* en *Zea mays* y *Phaseolus vulgaris* (UFC/g de muestra). / Presence of the strain IMI SD 187 of *P. chlamydosporia* var. *catenulata* in *Zea mays* and *Phaseolus vulgaris*

Valores de UFC/g de muestra								
Días	<i>Zea mays</i>				<i>Phaseolus vulgaris</i>			
	Suelo	Raíz	Tallo	Hojas	Suelo	Raíz	Tallo	Hojas
7	$6,1 \times 10^3$	$5,25 \times 10^2$	0	0	$5,2 \times 10^3$	$5,25 \times 10^2$	0	0
14	$4,9 \times 10^3$	$3,25 \times 10^2$	0	0	$4,45 \times 10^3$	4×10^2	0	0
21	5×10^3	$1,5 \times 10^2$	0	0	$3,9 \times 10^3$	10^2	0	0

CONCLUSIÓN

El bionemático evaluado no resultó fitotóxico a *Z. mays* y *P. vulgaris*.

REFERENCIAS

1. Ali, N.A.; Ater, M.; Sunahara, G.I. y Robidoux, P.Y. (2004): Phytotoxicity and bioaccumulation of copper and chromium using barley (*Hordeum vulgare* L.) in spiked artificial and natural forest soils. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 57(3): 363-74.
2. Bordallo, J.J.; Lopez-Llorca, L.V.; Jasson, H.B.; Salinas, J.; Persmark, L. y Arsenio, L. (2002): Effects of egg-parasitic and nematode-trapping fungi on plant roots. *New Phytologist.* 154: 491-499.
3. EPA (1996): Environmental Protection Agency. OPPTS Harmonized Test Guidelines. Series 885 Microbial Pesticides Test Guidelines-Final Guideline.
4. García, L.; Bulnes, C.; Melchor, G.; Vega, E.; Montes de Oca, N.; Hidalgo, L. y Marrero, E. (2004): Safety of *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* on acute oral and termal toxicity / pathogenicity evaluations in rats and rabbits. *Vet and Human Toxicology.* 46(5): 248-250.
5. García, L.; Melchor, G.; Montes de Oca, N. y Hidalgo, L. (2004): Estudio de la irritación ocular y dérmica de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*. *Rev Tox.* 21 (2-3): 103-107.
6. Hidalgo-Díaz, L.; Bourne, J.M.; Kerry, B.R. y Rodríguez, M. (2000): Nematophagous *Verticillium* spp. in soils infested with *Meloidogyne* spp. in Cuba: Isolation and screening. *Int. J. Pest. Manag.* 46: 277-284.
7. Kerry, B.R. y Bourne, J.M. (Eds.) (2002): A Manual for Research on *Verticillium chlamydosporium*, a Potential Biological Control Agent for Root-Knot Nematodes. *IOBC/WPRS*, University of Gent, 84p.
8. Kerry, B.R. e Hidalgo-Díaz, L. (2004): Application of *Pochonia chlamydosporia* in the integrated control of root-knot nematodes on organically grown vegetable crops in Cuba. En: *Multitrophic Interactions in Soil and Integrated Control*. Sikora, R.; Gowen, S.; Hauschild, R. y Kiewinick, S. (Eds.). *IOBC/WPRS Bull.* 27(1): 123-127.
9. Kerry, B.R.; Kikwood, I.A.; De Leij, F.A.A.M.; Barba, J.; Leidens, B.M. y Brookes, P.C. (1993): Growth and survival of *Verticillium chlamydosporium* Goddard, a parasite of nematodes in soil. *Biocontrol Sci Technol.* 3: 355-365.
10. López-Llorca, L.V.; Olivares-Bernabeau, C.; Salinas, J.; Jansson, H.B. y Kolattukudy, P.E. (2002): Prepenetration events in fungal parasitism of nematode eggs. *Mycol. Res.* 106:499-506.
11. Montes de Oca, Nivian (2004): Buenas prácticas de fabricación para la obtención de un bionemático a partir de la cepa Vcc 108 de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*. Tesis en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. UNAH-CENSA. La Habana, Cuba. 152 Págs.
12. OECD (2000): Organization for Economic Cooperation and Development. Guideline for testing of chemicals. Terrestrial (Non-target) Plant test: 208 A, Seedling Emergence and Seedling Growth test. Paris.
13. Peteira, Belkis; Montes de Oca, Nivian; Atkins, S.; Hidalgo-Díaz, L. y Kerry, B.R. (2005): 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.* 20(2): 102-109.

(Recibido 19-6-2006; Aceptado 5-4-2007)