

COMUNICACIÓN CORTA

Tolerancia de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (Kamyschko ex Barron y Onions) Zare y W. Gams a diferentes niveles de cloruro de sodio

W.G. Ceiro^I, Jersys Arévalo^{II}, Ana L. Puertas^I, L. Hidalgo-Díaz^{II}

^IFacultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Granma, Km 17½ carretera Bayamo-Manzanillo, Bayamo, Granma, Cuba. Correo electrónico: wceiroc@udg.co.cu; ^{II}Dirección de Protección de Plantas, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

RESUMEN: El estudio tuvo como objetivo determinar la tolerancia *in vitro* a diferentes niveles de cloruro de sodio de la cepa IMI SD 187 del hongo nematófago *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (Kamyschko ex Barron y Onions) Zare y W. Gams. El experimento se desarrolló en el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Cuba, utilizando los siguientes tratamientos: control (agua desionizada estéril 0,3dS.m⁻¹), 2dS.m⁻¹, 4dS.m⁻¹, 6dS.m⁻¹, 8dS.m⁻¹, 10dS.m⁻¹, 12dS.m⁻¹, 14dS.m⁻¹ y 16dS.m⁻¹ de NaCl. El diseño utilizado fue completamente aleatorizado con 5 repeticiones. La relación entre la inhibición de la germinación de clamidosporas, conidios y los diferentes niveles de estrés salino fueron analizados a través de regresión lineal. Las clamidosporas fueron más tolerantes que los conidios, con inhibición de 50% de la germinación a 13dS.m⁻¹ y 12dS.m⁻¹, respectivamente. A partir de los resultados, se deben realizar otros estudios para determinar la efectividad de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* como agente de control biológico de *Meloidogyne* spp., en suelos salinos, con el fin de recomendar la utilización integrada del hongo en los paquetes tecnológicos de producción, en agroecosistemas que tengan problemas de salinidad.

Palabras clave: salinidad, tolerancia, control biológico, *Meloidogyne* spp.

Tolerance of *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (Kamyschko ex Barron and Onions) Zare and W. Gams to different levels of sodium chloride.

ABSTRACT: Tolerance *in vitro* to different levels of sodium chloride of the strain IMI SD 187 of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (Kamyschko ex Barron and Onions) Zare and W. Gams was determined in a trial carried out at the National Center for Agricultural Health (CENSA), Cuba. Levels of sodium chloride (2dS.m⁻¹, 4dS.m⁻¹, 6dS.m⁻¹, 8dS.m⁻¹, 10dS.m⁻¹, 12dS.m⁻¹, 14dS.m⁻¹ and 16dS.m⁻¹) and deionized water (0.3dS.m⁻¹) as the control were used in a completely randomized design with 5 replications. The relationship between inhibition of germination of chlamydospores and conidia and the different levels of salinity stress were analyzed by linear regression. The chlamydospores were more tolerant to salinity than the conidia, with 50% inhibition of germination at 13dS.m⁻¹ and 12dS.m⁻¹ respectively. From the results obtained, further studies must be conducted to determine the effectiveness of *P. chlamydosporia* var. *catenulata* as a biological control agent of *Meloidogyne* spp., in saline soil with the purpose of recommending the integrated use of this fungus in technological packages of agricultural production in agroecosystems with salinity problems.

Key words: salinity, tolerance, biological control, *Meloidogyne* spp.

Aproximadamente el 40% de la superficie agrícola del planeta tiene problemas de salinidad. Muchas de estas áreas se encuentran en las regiones tropicales y del mediterráneo (1).

En Cuba, de unos 6,6 millones de hectáreas de suelos agrícolas, un millón presentan salinidad, representando el 15% de la superficie agrícola total. En el territorio oriental es donde más se manifiesta este

fenómeno con 54,7% del área afectada, lo cual es considerado como elemento de riesgo para la seguridad alimentaria en el país (2).

En plantas cultivables, una concentración elevada de sales en el suelo afecta negativamente el desarrollo, acumulación de biomasa y rendimiento agrícola, debido fundamentalmente a los efectos osmóticos e iónicos. Una de las causas de afectación en los suelos salinos es la absorción y acumulación en las células vegetales de un exceso de iones hidrofílicos osmóticamente activos (3). Efectos adversos también pueden manifestarse en la biota de microorganismos que habitan en agroecosistemas con estrés salino; sin embargo, son escasos los estudios del impacto de estas condiciones sobre la efectividad de agentes de control biológico.

Por lo tanto, la tolerancia al estrés por salinidad de agentes de control biológico debe ser una prioridad para esta línea de investigación, pues actualmente se desconoce su efectividad frente a los organismos dianas en estas condiciones, y se corre el riesgo de usarlos indebidamente para el manejo integrado de plagas (MIP) en agroecosistemas con estas características.

En Cuba, se aislaron y evaluaron diferentes especies de *Pochonia chlamydosporia* para el manejo de *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood. De los aislamientos estudiados, se seleccionó la cepa IMI SD 187 de la variedad *catenulata* como la más promisoría (4), la cual dio origen al producto comercial KlamiC® (5). Por esta razón, la investigación tuvo como objetivo determinar la tolerancia *in vitro*, de esta cepa, a diferentes niveles de cloruro de sodio.

El experimento se desarrolló en el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Cuba. Para ello se empleó el producto KlamiC®, lote 010211 (1,76x10⁷ Unidades Formadoras de Colonias por gramo de producto seco). Un gramo del producto se depositó durante una hora en tubos que contenían 9ml de soluciones salinas esterilizadas (NaCl), las que habían sido previamente ajustadas a diferentes conductividades eléctricas (0,3dS.m⁻¹, 2dS.m⁻¹, 4dS.m⁻¹, 6dS.m⁻¹, 8dS.m⁻¹, 10dS.m⁻¹, 12dS.m⁻¹, 14dS.m⁻¹, 16dS.m⁻¹), utilizando un conductímetro (CDM 230-MeterLab®). A partir de cada solución salina se tomó 1mL y se prepararon diluciones seriadas en volumen final de 10mL. Cada dilución salina representó un tratamiento, con 5 repeticiones bajo un diseño completamente aleatorizado. Como tratamiento control se utilizó agua desionizada estéril 0,3dS.m⁻¹.

Para evaluar la tolerancia de las clamidosporas expuestas a diferentes niveles de cloruro de sodio, se tomó la dilución 10⁻² de cada tratamiento, la cual fue

homogenizada con un agitador de tubos (VORTEX-1 GENIE®). De ellas se extrajeron 200µL con una pipeta automática y se depositaron en placas Petri (80mm) que contenían medio de cultivo agar agua antibiótico (AAA: 15g de agar bacteriológico (BioCen) por litro de agua destilada, 50mg de sulfato de estreptomicina, 50mg cloranfenicol y 50mg clortetraciclina), y con ayuda de una espátula de Drigalski fueron esparcidos sobre la superficie. Las placas se sellaron con parafilm e incubaron a 25°C durante 48h. Al momento de la evaluación cada placa fue dividida en cuatro cuadrantes para facilitar el conteo. Se contabilizaron en microscopio óptico (ZEISS-AxioLab®, 200x) 100 clamidosporas por cada cuadrante, denotando las que estaban germinadas.

En el caso de los conidios se utilizó la dilución 10⁻³, de la que se extrajeron 200µL con una pipeta automática y se depositaron en cuatro puntos previamente seleccionados en las placas Petri que contenían medio de cultivo AAA. Luego se sellaron con parafilm e incubaron a 25°C durante 21h. Posteriormente, se realizó el conteo en cada punto donde se depositó la suspensión que contenía los conidios y se contabilizaron, en microscopio óptico, 100 conidios y de ellos los que habían germinado.

En ambos casos se consideró que la estructura había germinado cuando el tubo germinativo superaba dos veces el tamaño de la clamidospora y/o conidio. El porcentaje de germinación calculado se usó para determinar la inhibición de la germinación respecto al control.

La relación entre la concentración salina con los porcentajes de inhibición de la germinación de clamidosporas y conidios se obtuvo mediante análisis de regresión lineal, procesado con el paquete estadístico STATISTICA v. 8. A partir de las ecuaciones de regresión se calcularon los niveles que produjeron una inhibición del 50% de la germinación.

Un 98% de las variaciones que tuvo la inhibición de la germinación de las clamidosporas dependió de los niveles de sal a que fue expuesto el producto. Aunque, en todos los niveles las clamidosporas germinaron, la inhibición de la germinación incrementó a medida que aumentó la concentración de sales. El 50% de inhibición se alcanzó a los 13dS.m⁻¹ (Figura 1).

Un 96% de las variaciones que tuvo la inhibición de la germinación de conidios dependió de los niveles de sal a que fue expuesto el producto. Aunque, en todos los niveles los conidios germinaron, la inhibición de la germinación incrementó a medida que aumentó la concentración de sales. El 50% de inhibición se alcanzó a los 12dS.m⁻¹ (Figura 2).

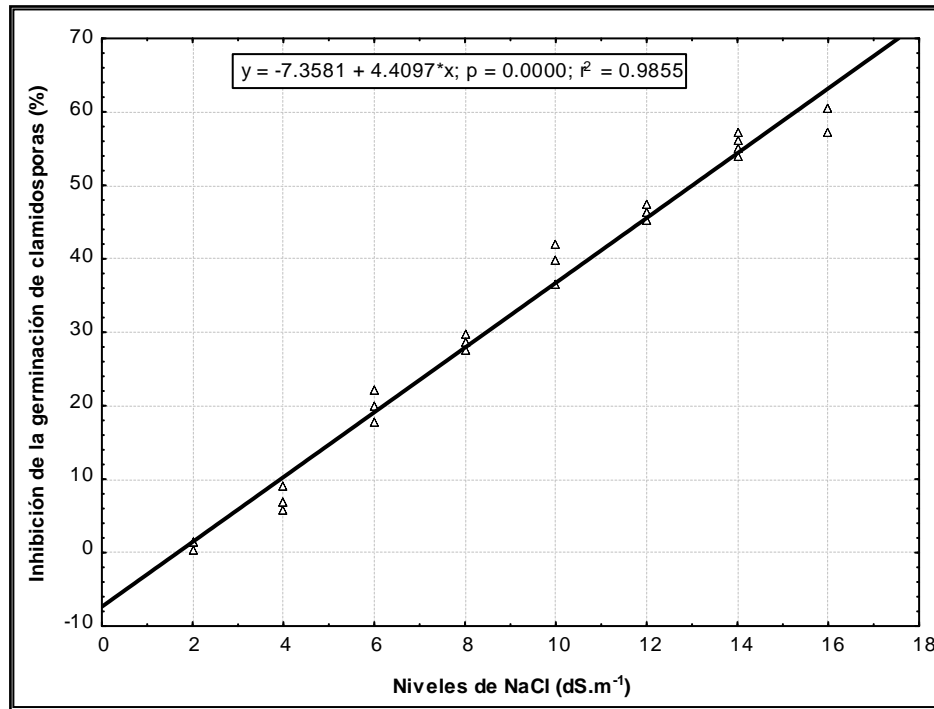


FIGURA 1. Inhibición de la germinación de clamidosporas de *P. chlamydo-sporia* var. *catenulata* (IMI SD 187) frente a niveles de salinidad *in vitro*./ *Inhibition of chlamydo-spore germination of P. chlamydo-sporia* var. *catenulate* (IMI SD 187) under *in vitro* salinity conditions.

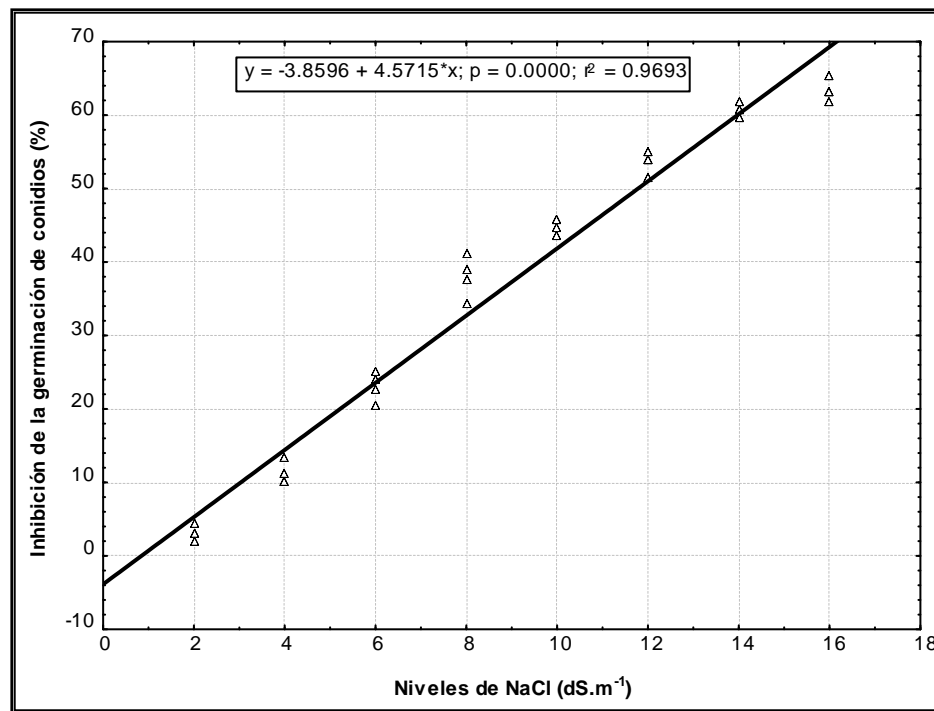


FIGURA 2. Inhibición de la germinación de conidios de *P. chlamydo-sporia* var. *catenulata* (IMI SD 187) frente a niveles de salinidad *in vitro*./ *Inhibition of conidia germination of P. chlamydo-sporia* var. *catenulate* (IMI SD 187) under *in vitro* salinity conditions.

Los resultados demostraron que, en las condiciones experimentales evaluadas, lograron germinar las clamidosporas y conidios del hongo nematófago *P. chlamydosporia* var. *catenulata* (IMI SD 187) al ser expuestos a altos niveles de cloruro de sodio. Resultando las clamidosporas más tolerantes que los conidios debido, posiblemente, a que son estructuras de resistencia con varias células y paredes gruesas.

Aunque son escasos los estudios sobre tolerancia a diferentes niveles de sales en agentes de control biológicos, Gajanan *et al.* (6) informaron que aislamientos de *Bacillus* sp., fueron tolerantes a altas concentraciones de NaCl en medio de cultivo *in vitro*. Otros autores dieron a conocer que especies de *Bacillus* sp., *Aspergillus* sp., y *Trichoderma* sp., tenían potencialidades para su adaptación y uso en condiciones de estrés abiótico por salinidad (7,8).

Por otra parte, se ha informado que *P. chlamydosporia*, además de ser un hongo parásito facultativo de huevos de nematodos fitoparásitos sedentarios, es un hongo endófito facultativo de plantas (9). Recientemente, se demostró que otros hongos endófitos fueron responsables de activar mecanismos de biosíntesis de compuestos orgánicos en las plantas, para atenuar diferentes tipos de estrés, entre ellos salinidad, sequía, altas y bajas temperaturas (10).

Estudios futuros son necesarios para conocer si las plantas colonizadas endófitamente con este hongo nematófago mejoran la tolerancia de las mismas al estrés por salinidad, lo cual tendría una importancia práctica en el uso de KlamiC® en agroecosistemas que tengan problemas de salinidad.

REFERENCIAS

1. Gisbert C, Rus AM, Bolarin Carmen, Arrillaga Isabel, Montensinos C, Caro M, et al. The Yeast HAL1 gene improves salt tolerance of Tomato. *Plant Physiology*. 2000;123:393-402.
2. Programa Mundial de Alimentos. Análisis y cartografía de la vulnerabilidad a la seguridad alimentaria en Cuba. Publicación de la Representación del Programa Mundial de Alimentos en Cuba. 2001;38:19-20.
3. Morales D, Bolarín María del C, Cayuela Encarna. Respuesta de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) de la variedad LP-7 a la aplicación de diferentes niveles de NaCl. II. Iones inorgánicos y orgánicos. *Cultivos Tropicales*. 2008;29(3):59-62.
4. Hidalgo-Díaz L, Bourne JM, Kerry BR, Rodríguez M. Nematophagous *Verticillium* spp., in soils infested with *Meloidogyne* spp., in Cuba: isolation and screening. *Int. J. Pest. Manag.* 2000; 46:277-284.
5. Hernández MA, Hidalgo-Díaz L. KlamiC: Bionematicida agrícola producido a partir del hongo *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*. *Protección Veg.* 2008;23 (2):131-134.
6. Gajanan G, Sambhaji D, Punaji D, Kaustubh R. Isolation and characterization of salt-tolerant nitrogen-fixing microorganisms from food. *EurAsia. J BioSci.* 2010;4, 33-40.
7. Ruiz C, Béjar V, Martínez F, Llamas I, Quesada E. *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Vélez in Málaga, southern Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2005;55,191-195.
8. Sivaprakasam S, Mahadevan S, Sekar S, Rajakumar S. Biological treatment of tannery wastewater by using salt-tolerant bacterial strains. *Microbial Cell Factories*. 2008;7:15.
9. Bollardo JJ, López-Llorca LV, Jansson HB, Salinas L, Persmark L, Asensio L. Colonization of plant roots by eggs parasitic and nematode trapping fungi. *New Phytologist*. 2002;54:491-499.
10. Lamabam P, Singh S, Tuteja N. Unraveling the role of fungal symbionts in plant abiotic stress tolerance. *Plant Signal Behav.* 2011;6(2):175-191.

Recibido: 6-12-2011.

Aceptado: 8-8-2012.