

## 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

## Interaction between *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (Kamyschko ex Barron y Onions) Zare and Gams AND *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood in tomato in the presence of NaCl

Leopoldo Hidalgo-Díaz<sup>1</sup>, Wilson G. Ceiro<sup>2</sup>✉

<sup>1</sup> Dirección de Sanidad Vegetal, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), CP 32700, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Granma, Bayamo, Granma, Cuba.

**RESUMEN:** La investigación tuvo como propósito determinar el efecto de una concentración de 50 mmol.L<sup>-1</sup> de NaCl sobre la interacción entre la cepa IMI SD 187 de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* Kamyschko ex Barron y Onions) Zare y Gams y *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) en el cultivo de tomate. Para ello, se estableció un experimento en el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Cuba, con siete tratamientos y un control; estos se conformaron mediante la acción aislada y la interacción hongo-nematodo en presencia de NaCl y utilizando el tomate como hospedante. Luego de 65 días se evaluaron el índice de agallamiento, la cantidad de juveniles de segundo estadio de *M. incognita* en el suelo, la actividad saprofítica y parasítica de la cepa IMI SD 187, se registró el pH potenciométrico y la conductividad eléctrica del suelo. Se usó un diseño completamente aleatorizado con cinco réplicas por cada tratamiento. El procesamiento estadístico se efectuó mediante un ANOVA unifactorial y las medias se compararon con la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), procesado con el paquete STATISTICA v. 8. Los resultados demostraron que la cepa IMI SD 187 colonizó la raíz en un rango de 1,9-4,2x10<sup>3</sup> UFC, registró una población en el suelo de 1,5-3,3x10<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.

**Palabras clave:** control biológico, hongo nematófago, salinidad, tomate.

**ABSTRACT:** The experiment was aimed at determining the effect of 50 mmol.L<sup>-1</sup> of NaCl on the interaction between the strain IMI SD 187 of *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* Kamyschko ex Barron y Onions) Zare and Gams and *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) in tomato plant. For it, a completely randomized design with seven treatments and one control and with five replicas was set up at the National Center for Plant and Animal Health (CENSA, Cuba). The treatments consisted of the separated action of the fungus and the nematode and their interaction in tomato in the presence of NaCl. After 65 days, gall index, number of *M. incognita* second stage juveniles in the soil, and the saprophytic and parasitic activity of the strain IMI SD 187 were evaluated, and the potentiometric pH and soil electrical conductivity were recorded. One-way ANOVA was used and the treatment means were compared with Tukey test ( $p \leq 0.05$ ), processed with STATISTICA v. 8 software. The results showed that the strain IMI SD 187 colonized the root in a range of 1.9-4.2x10<sup>3</sup> CFU, reached a population record in the soil of

✉ Autor para correspondencia: Wilson G. Ceiro. E-mail: [wceiroc@udg.co.cu](mailto:wceiroc@udg.co.cu), [wceiroc@gmail.com](mailto:wceiroc@gmail.com)

Recibido: 27/10/2016

Aceptado: 26/12/2016

$1.5-3.3 \times 10^4$  CFU, parasitized 63% of the nematode eggs, and colonized 80% of the egg masses in the presence of NaCl.

**Key words:** biological control, nematophagous fungus, salinity, tomato.

## INTRODUCCIÓN

El hongo *Pochonia chlamydosporia* (Kamyschko ex Barron y Onions) Zare y Gams es ampliamente reconocido como parásito facultativo de huevos de nematodos formadores de agallas y de quistes; su habilidad saprofitica le posibilita persistir, naturalmente, en los suelos y los sustratos, lo que facilita su multiplicación *in vitro* (1,2). Su efectiva actividad parasítica fundamentó su utilización para el manejo de nematodos fitoparásitos en cultivos hortícolas (3,4).

Este hongo muestra otras ventajas: es colonizador endófito de la rizosfera de especies monocotiledóneas (5), antagonista de hongos fitopatógenos (6), estimulador del crecimiento vegetal (7) y sobrevive al efecto de plaguicidas y bioestimulantes vegetales (8).

Recientemente se demostró que los conidios y las clamidosporas de la cepa IMI SD 187 de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* son viables a altas concentraciones de NaCl en condiciones *in vitro* (9,10), lo que sugiere la posibilidad de utilizar esta cepa en el manejo de *Meloidogyne* spp. en agroecosistemas afectados por salinidad.

Por otra parte, los nematodos fitoparásitos sobreviven a altas concentraciones de NaCl y estos poseen la capacidad de adaptarse fácilmente a condiciones ecológicas salinas (11). Asimismo, los cultivos hortícolas se caracterizan por tener una alta susceptibilidad a *Meloidogyne* spp. (12) y, específicamente en los Sistemas de Producción Protegido de Hortalizas (SPPH) en Cuba, se registraron infestaciones por este nematodo. Se demostró así que la especie más distribuida es *M. incognita*, la cual causa afectaciones severas a los cultivos de *Cucurbitaceae* y *Solanaceae* (13).

Además de la problemática de los nematodos, los SPPH se caracterizan por presentar niveles

de conductividad eléctrica que oscilan entre 2-6 dS.m<sup>-1</sup> causado por efecto del fertirriego.

Teniendo en cuenta lo expuesto, se propuso como objetivo de esta investigación determinar el efecto de una concentración de 50 mmol.L<sup>-1</sup> de NaCl sobre la interacción entre la cepa IMI SD 187 y *M. incognita* en el cultivo de tomate.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en condiciones semicontroladas en el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Cuba.

Como fuente de inóculo se utilizó el lote 110413 del producto KلاميC®, cuyo ingrediente activo es la cepa IMI SD 187 de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* (Concentración de clamidosporas  $1,13 \times 10^7$ . g<sup>-1</sup> de producto seco, viabilidad 91,50% y humedad 6,12%). El inóculo de nematodos provino de una población pura de *M. incognita*, procedente del Laboratorio de Nematología del CENSA, identificada mediante técnicas morfológicas y moleculares (14).

Se utilizó un suelo Fluvisol Típico (Ca: 23,83 cmol.kg<sup>-1</sup>; Mg: 15,33 cmol.kg<sup>-1</sup>; P: 671,66 ppm; N: 2,16%; MO: 3,79% y CE: 0,6 dS.m<sup>-1</sup>), obtenido del módulo de SPPH de Veguitas (20°18'53" N y 76°55'4" W), provincia Granma, Cuba.

El suelo se homogenizó, se esterilizó en un horno eléctrico (250°C, dos horas), se transfirió a macetas de un kilogramo de capacidad y en ellas se trasplantó una plántula de tomate (*Solanum lycopersicon* L.) cv. HA 3057 con 25 días de edad crecidas en un cepellón.

La concentración de NaCl utilizada como tratamiento fue 50 mmol.L<sup>-1</sup>, equivalente a una conductividad eléctrica de 6,1 dS.m<sup>-1</sup>, definida como moderadamente salina, según informó Yadav *et al.* (15). Dicho tratamiento se seleccionó teniendo en cuenta que, en estudios anteriores (9,10), se evidenció viabilidad de

esporas y crecimiento micelial de la cepa IMI SD 187, expuesta a esa concentración salina.

Para establecer el experimento, con un diseño completamente aleatorizado con cinco réplicas por cada tratamiento, se utilizaron los siguientes tratamientos:

1. C: Control (riego con agua desionizada 0,2 dS.m<sup>-1</sup>).
2. P: Cepa IMI SD 187 [plántulas colonizadas con el hongo desde cepellón (500 g de KlamiC<sup>®</sup>.m<sup>3</sup> de sustrato) + aplicación al suelo al momento del trasplante (5x10<sup>3</sup> clamidosporas.g<sup>-1</sup> de suelo)].
3. N: *M. incognita*.
4. S: Riego con 50 mmol.L<sup>-1</sup> (6,3 dS.m<sup>-1</sup>) de NaCl disuelto en agua desionizada.
5. Interacción P+N.
6. Interacción P+S.
7. Interacción N+S.
8. Interacción N+P+S.

Posterior al trasplante, se efectuó el riego manual en días alternos; en el caso de los tratamientos que no recibieron el NaCl, se utilizó agua desionizada. Los tratamientos, donde estaban presentes los nematodos, se establecieron a los siete días posteriores al trasplante, inoculando 1,5 juveniles de segundo estadio (J<sub>2</sub>).g<sup>-1</sup> de suelo. Las plantas se mantuvieron en desarrollo durante 65 días posteriores al trasplante, dentro de una casa de mallas, donde las temperaturas fluctuaron entre 24±3°C.

Transcurrido ese tiempo, se determinó el índice de agallamiento, según la escala propuesta por Taylor y Sasser (16); los J<sub>2</sub> de *M. incognita* se extrajeron por el método de bandejas de Whitehead y Hemming (17) y se contabilizaron.

Se determinaron el número de unidades formadoras de colonias (UFC) de la cepa IMI SD 187 en la raíz y en el suelo, la colonización de masas de huevos y el parasitismo de huevos, según la metodología propuesta por Kerry y Bourne (18).

Se registró el pH potenciométrico y la conductividad eléctrica (CE) del suelo al finalizar el experimento, según las

recomendaciones sustentadas por Paneque *et al.* (19); los valores se determinaron en un pHmetro y un conductímetro, respectivamente.

El procesamiento estadístico se efectuó mediante un ANOVA unifactorial y las medias se compararon con la prueba de comparación múltiple de Tukey (p≤0,05), utilizando el paquete STATISTICA v. 8.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los mayores valores del índice de agallamiento, causado por *M. incognita* en el hospedante, se registraron en los tratamientos N y P+N, los cuales difirieron de los que alcanzaron menores valores N+S y la interacción N+P+S; esta última mostró el menor valor con diferencias de los demás tratamientos (Tabla 1).

La interacción N+P+S registró el menor índice de agallamiento en el tomate, debido, probablemente, a una menor abundancia de los J<sub>2</sub> de *M. incognita* en ese tratamiento.

Lo expuesto pudo estar relacionado con dos elementos claves: el primero concerniente al modo de acción de esta especie fúngica, que ejerció su actividad parasítica sobre dos o tres generaciones de huevos de *M. incognita* en los dos meses de duración del experimento y, el segundo, relativo al efecto de la sal utilizada.

La mayor cantidad de J<sub>2</sub> de *M. incognita* se registró en los tratamientos N y P+N, sin diferencias entre sí; mientras que los menores valores correspondieron a la interacción N+S y N+P+S que difirieron de los restantes tratamientos (Tabla 1).

El resultado sugiere que la presencia de NaCl tuvo un efecto sobre los J<sub>2</sub> de *M. incognita*. Al respecto Edongali *et al.* (11) informaron que en tratamientos con una conductividad eléctrica entre 1,5-5,0 dS.m<sup>-1</sup> de NaCl se redujo, significativamente, la cantidad de J<sub>2</sub> y de machos de *M. incognita* en tomate cv. Hunts 2580.

Por otro lado, Barbercheck y Duncan (20) informaron que el NaCl afectó la quimio-orientación, la locomoción a través del suelo y

la reproducción de nematodos fitoparásitos y entomopatógenos.

La mayor cantidad de UFC en la raíz se obtuvo en la interacción N+P+S y P+N, sin diferencias entre sí, mientras que este último tratamiento no difirió de P y, finalmente, los tratamientos P+S y P registraron la menor colonización. Similar al resultado anterior, se constató que la mayor cantidad de UFC en el suelo se alcanzó en las interacciones N+P+S y P+N, que difirieron de los que obtuvieron menores valores P y P+S; este último tratamiento obtuvo la menor colonización (Tabla 1).

La sobrevivencia de la cepa IMI SD 187 en el suelo y en las raíces de tomate bajo efectos del NaCl se relaciona con la abundante

germinación de clamidosporas y conidios del hongo, al interactuar con concentraciones de esta sustancia, lo que se evidenció en condiciones *in vitro* (9).

Por otra parte, los resultados sugieren que la cepa IMI SD 187 incrementó sus poblaciones en presencia de los tratamientos donde se encontraba su hospedante común (*M. incognita*), lo cual le permitió ejercer su actividad parasítica sobre el nematodo.

El mayor parasitismo de huevos y colonización de masas de huevos, de la cepa IMI SD 187 sobre *M. incognita*, se observó en el tratamiento P+N comparado con la interacción N+P+S (Tabla 1).

Este resultado evidenció que la cepa IMI SD 187 logró parasitar a *M. incognita* en presencia

**TABLA 1.** Interacción entre la cepa IMI SD 187 y *M. incognita* en presencia de NaCl (50 mmol.L<sup>-1</sup>) en tomate cv. HA 3057. / Interaction between the strain IMI SD 187 and *M. incognita* in tomato in the presence of NaCl (50 mmol.L<sup>-1</sup>).

Ttos	IA	J <sub>2</sub> (100 g <sup>-1</sup> de suelo)	UFCr (10 <sup>3</sup> )	UFCs (10 <sup>4</sup> )	PHu (%)	CMH (%)	pH	CE (dS.m <sup>-1</sup> )
P	-	-	2,5 bc	2,8 b	-	-	7,87	2,14
N	5,00 a	348,00 a	-	-	-	-	7,89	2,11
S	-	-	-	-	-	-	7,86	5,44
P+N	4,67 ab	297,00 a	3,4 ab	3,3 a	72,00 a	90,67 a	7,88	2,11
P+S	-	-	1,9 c	1,5 c	-	-	7,90	5,12
N+S	4,50 b	190,00 b	-	-	-	-	7,84	5,37
N+P+S	4,00 c	94,00 b	4,2 a	3,3 a	63,00 b	80,00 b	7,86	5,26
C	-	-	-	-	-	-	7,87	2,18
<b>EE</b>	<b>0,10</b>	<b>0,07</b>	<b>0,01</b>	<b>0,05</b>	<b>0,02</b>	<b>0,07</b>	-	-

P: Cepa IMI SD 187, N: *M. incognita*, S: NaCl [50 mmol.L<sup>-1</sup> (6,3 dS.m<sup>-1</sup>)], P+N: Interacción cepa IMI SD 187+*M. incognita*, P+S: Interacción cepa IMI SD 187+NaCl, N+S: Interacción *M. incognita*+NaCl, N+P+S: Interacción cepa IMI SD 187+*M. incognita* +NaCl, C: Control, J<sub>2</sub>: juveniles de *M. incognita*, IA: índice de agallamiento, UFCr: unidades formadoras de colonias en la raíz, UFCs: unidades formadoras de colonias en el suelo, PHu: parasitismo de huevos, CMH: colonización de masas de huevos, pH: pH potenciométrico, CE: conductividad eléctrica, EE: error estándar. Letras distintas en las columnas evidencian diferencias significativas según la prueba de Tukey (p≤0,05). / P: IMI SD 187 strain, N: *M. incognita*, S: NaCl [50 mmol.L<sup>-1</sup> (6,3 dS.m<sup>-1</sup>)], P+N: Interaction IMI SD 187 strain+*M. incognita*, P+S: Interaction IMI SD 187 strain+NaCl, N+S: Interaction *M. incognita*+NaCl, N+P+S: Interaction IMI SD 187 strain+*M. incognita*+NaCl, C: Control, J<sub>2</sub>: *M. incognita* juvenile, IA: galling index, PHu: parasitized eggs, CMH: egg mass colonization, CFUr: root colony forming units, Cs: soil colony forming units, pH: potentiometric pH, CE: electric conductivity, EE: standard error. Different letters in columns show significant differences according to Tukey test (p≤0.05).



de 50 mmol.L<sup>-1</sup> de NaCl, aunque dicho tratamiento afectó el parasitismo de huevos en 13% y la colonización de masas de huevos en 12%.

Lo expuesto se relaciona con lo demostrado por Ceiro *et al.* (9,10), quienes constataron que, al incrementar las concentraciones de NaCl, se afectó la germinación de conidios y clamidosporas, así como el crecimiento micelial de la cepa IMI SD 187 en condiciones *in vitro*.

El rango de parasitismo de huevos de 63-72%, evidenciado en esta investigación, posee relación con lo informado por Arévalo *et al.* (21), pues demostraron que, en ausencia de NaCl, la cepa IMI SD 187 parasitó a *M. entorolobii* entre 37-74%.

El pH inicial, registrado en el suelo objeto de estudio, fue de 7,85 y, al finalizar el mismo, se constataron valores similares entre los tratamientos: oscilaron entre 7,84-7,90 (Tabla 1).

Estos resultados de pH se clasifican como básicos, según Paneque y Calaña (19), y no ofrecieron riesgos para establecer al cultivo de tomate cv. HA 3057 bajo las condiciones experimentales evaluadas.

La conductividad eléctrica del suelo resultó mayor en los tratamientos donde se utilizó el NaCl con relación a los que no recibieron la sal (Tabla 1). Lo expuesto explica que, bajo las condiciones analizadas, los tratamientos salinos no alteraron el pH del suelo al momento que se realizaron las evaluaciones.

Finalmente, los resultados demostraron que la cepa IMI SD 187 colonizó la raíz, el suelo y parasitó a *M. incognita* en presencia de 50 mmol.L<sup>-1</sup> de NaCl, lo cual señala la importancia de realizar otros estudios en el futuro, con vistas a profundizar en el efecto de dicha cepa en el manejo de *M. incognita* en agroecosistemas afectados por niveles moderados de salinidad.

## REFERENCIAS

1. Siddiqui ZA, Akhtar MS. Synergistic effects of antagonistic fungi and a plant growth promoting rhizobacterium, an arbuscular mycorrhizal fungus, or composted cow manure on populations of *Meloidogyne incognita* and growth of tomato. *Bioc Sci. Technol.* 2008; 18(3): 279-290.
2. Kerry BR, Hirsch PR. Ecology of *Pochonia chlamydosporia* in the rhizosphere at the population, whole organism and molecular scales (Chapter 7). Keith Davies and Yitzhak Spiegel (eds.). *Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes: Building Coherence between Microbial Ecology and Molecular Mechanisms.* Springer Dordrecht Heidelberg London New York Library of Congress Control Number: 2011928081. ©Springer Science + Business Media B.V. 2011; p. 171-182.
3. Hernández MA, Hidalgo-Díaz L. KlamiC®: Bionematicida agrícola producido a partir del hongo *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*. *Rev. Protección Veg.* 2008; 23(2): 131-134.
4. Manzanilla R, Esteves I, Finetti M, Hirsch P, Ward E, Devonshire J, Hidalgo-Díaz L. *Pochonia chlamydosporia*: Advances and challenges to improve its performance as a biological control agent of sedentary endoparasitic nematodes. *J. Nematol.* 2013; 45(1): 1-7.
5. López-Llorca LV, Gómez-Vidal S, Monfort E, Larriba E, Casado-Vela J, Elortza F, Jansson H-B, Salinas J, Martín-Nieto J. Expression of serine proteases in egg-parasitic nematophagous fungi during barley root colonization. *Fungal Genet. Biol.* 2010; 47:342-351.
6. Maciá-Vicente J, Rosso LC, Ciancio A, Jansson HB, López-Llorca LV. Colonisation of barley roots by endophytic *Fusarium equiseti* and *Pochonia chlamydosporia*: effects on plant growth and disease. *Ann Appl Biol.* 2009; 155:391-401.
7. Ayatollahy E, Seddighe Fatemy, Hassan RE. Potential for biological control of *Heterodera schachtii* by *Pochonia*

- chlamydosporia* var. *chlamydosporia* on sugar beet. *Bioc Sci. Technol.* 2008; 18(2): 163-167.
8. Ceiro WG, Arévalo J, Hidalgo-Díaz L. Efectos de plaguicidas y bioestimulantes vegetales sobre la germinación de clamidosporas y desarrollo *in vitro* del hongo nematófago *Pochonia chlamydosporia*. *Rev. Iberoam Micol.* 2015; 32(4):277-280.
  9. Ceiro WG, Arévalo J, Puertas AL, 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(31): 70-73.
  10. Ceiro WG, Arévalo J, Puertas AL, 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.
  11. Edongali EA, Duncan L, Ferris H. Influence of salt concentration on infectivity and development of *Meloidogyne incognita* on tomato. *Revue Nématol.* 1982; 5 (1): 111-127.
  12. Rodríguez MG, Sánchez L, Gómez L, Hidalgo-Díaz L, Gómez M, Díaz-Viruliche L, Casanova A, Cuadra R. *Meloidogyne* spp., plagas de las hortalizas: alternativas para su manejo en sistemas de cultivo protegido. *Rev. Protección Veg.* 2005; 20(1): 1-10.
  13. Gómez L, Rodríguez MG, Enrique R, Miranda I, González E. Factores limitantes de los rendimientos y calidad de las cosechas en la producción protegida de hortalizas en Cuba. *Rev. Protección Veg.* 2009; 24(2): 117-122.
  14. Gómez L. Diagnóstico de nematodos agalleros y prácticas agronómicas para el manejo de *Meloidogyne incognita* en la Producción Protegida de Hortalizas. [Tesis para optar por el Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas]. Universidad Agraria de La Habana- Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. 2007; p. 100.
  15. Yadav S, Irfan M, Ahmad A, Hayat S. Causes of salinity and plant manifestations to salt stress: A review. *J. Environ. Biol.* 2011; 32:667-685.
  16. Taylor AL, Sasser JN. Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). Cooperative publications, Dept. Plant Pathology, North Carolina State Univ. & U.S. Agency of International Development, Raleigh. 1978; p. 111.
  17. Whitehead AG, Hemming JR. A comparison of some quantitative methods of extracting small vermiform nematodes from soil. *Ann Appl Biol.* 1965; 55:25-38.
  18. Kerry BR, Bourne JM. (eds.). A Manual for Research on *Verticillium chlamydosporium*, a Potential Biological Control Agent for Root-Knot Nematodes. IOBC/WPRS, University of Gent. 2002; p. 84.
  19. Paneque VM, Calaña JM, Calderón M, Borges Y, Hernández T, Caruncho M. Manual de técnicas analíticas para análisis de suelo, foliar, abonos orgánicos y fertilizantes químicos. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). 2010; p. 153.
  20. Barbercheck ME, Duncan L. Abiotic Factors (Chap. 11). *Nematode behaviour*. Randy Gaugler, Anwar L. Bilgrami (Eds). CAB International. 2004; p. 309-345.
  21. Arévalo J, Silva SD, Carneiro M, Lopes RB, Carneiro R, Tigano M, Hidalgo-Díaz L. 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.* 2012; 27(3): 167-173.