

EFECTO *In vitro* DE *Purpureocillium lilacinum* (THOM) LUANGSA-ARD *et al.* Y *Pochonia chlamydosporia* (GODDARD) ZARE Y GAMS SOBRE EL NEMATODO BARRENADOR *Radopholus similis* (COBB) THORNE

Daniel Vergara Alzate*, Óscar Adrián Guzmán Piedrahita**, Jairo Leguizamón Caycedo***

* Ingeniero Agrónomo, Universidad de Caldas. Colombia. Correo electrónico: d-rock666@hotmail.com

** M.Sc. Profesor Asistente, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Caldas. Colombia. Correo electrónico: oscar.guzman@ucaldas.edu.co

*** Ph.D. Fitopatólogo Investigador. Correo electrónico: jleg@une.net.co.

Recibido: 10 de agosto; aprobado: 15 de octubre de 2012

RESUMEN

Los nematodos fitoparásitos pueden controlarse con hongos que los infectan y pueden ser una alternativa ambientalmente segura para reducir el uso de nematicidas. El objetivo de esta investigación fue evaluar la infección a nivel *in vitro* de *Purpureocillium lilacinum* y *Pochonia chlamydosporia* sobre *Radopholus similis*. Bajo un diseño experimental completamente aleatorio en cajas Petri con Papa-Dextrosa-Agar se les adicionó, y evaluó por separado, 1 mL de *P. lilacinum* y *P. chlamydosporia* en una concentración de $1,03 \times 10^8$ esporas.mL⁻¹; asimismo se les adicionó 30 µL que contenían 50 huevos, juveniles y adultos de *R. similis*. El anterior procedimiento también se realizó para el testigo carbofuran y agua. Se evaluó la infección de los hongos sobre los fitonematodos cada 12 h hasta las 120 h. Se encontró que *P. lilacinum* y *P. chlamydosporia*, a las 24 h de estar en contacto con los huevos, juveniles y adultos, infectaron entre el 2 y 11% de estos. Después de este tiempo, a las 120 h, el porcentaje de individuos infectados aumentó entre 61 y 85%. Estos resultados fueron estadísticamente diferentes a los tratamientos con carbofuran y agua donde no ocurrió destrucción o daño sobre huevos; mientras que sobre juveniles y adultos, el testigo carbofuran y agua a las 48 h de exposición de los fitonematodos tuvo una mortalidad del 90 y 2%, respectivamente. En condiciones *in vitro*, *P. lilacinum* y *P. chlamydosporia* tienen un aumento creciente en individuos infectados desde las 12 h hasta las 120 h, sobre huevos, juveniles y adultos de *Radopholus similis*, convirtiéndose en una alternativa promisoriosa para su control en condiciones de campo dentro de un manejo integrado de plagas.

Palabras clave: control biológico, fitonematodo, infección.

ABSTRACT

In vitro EFFECT OF *Purpureocillium lilacinum* (THOM) LUANGSA-ARD *et al.* AND *Pochonia chlamydosporia* (GODDARD) ZARE AND GAMS ON *Radopholus similis* (COBB) THORNE BURROWING NEMATODE

The phytoparasitic nematodes can be controlled with fungi that infect them and can be an environmentally safe alternative to reduce the use of nematicides. The objective of this research was to evaluate the *Purpureocillium lilacinum* and *Pochonia chlamydosporia* infection on *Radopholus similis* at *in vitro* level. Under an experimental design completely at random in Petri dishes with Potato-Dextrose-Agar 1 mL of *P. lilacinum* and *P. chlamydosporia* in $1,03 \times 10^8$ esporas.mL⁻¹ concentration were added and evaluated separately. Similarly, 30 µL was conditioned containing 50 *R. similis* eggs, juveniles and adults. The previous procedure was also carried out for the carbofuran and water control. The fungus infection on phytoparasitic nematodes was evaluated every 12 h up to the 120 h. It was found that after 24 h of being in contact with the eggs, juveniles and adults *P. lilacinum* and *P. chlamydosporia*, infected between 2% and 11% of them. After this period of time, at 120 h, the percentage of infected individuals increased between 61% and 85%. These results were statistically different from the carbofuran and water treatments in which no destruction or damage were caused on the eggs, while on juveniles and adults the carbofuran and water control showed mortality of 90% and 2% respectively after 48 h of exposure to the phytoparasitic nematodes. In *in vitro* conditions, *P. lilacinum* and *P. chlamydosporia* increase in infected individuals from the 12 h to the 120 h on *Radopholus similis* eggs, juveniles and adults becoming a promising alternative for its control in field conditions within an integrated pest management system.

Key words: biological control, phytoparasitic nematode, infection.

INTRODUCCIÓN

El control biológico de nematodos fitoparásitos es una alternativa ambientalmente segura para reducir el uso de nematicidas químicos en el manejo integrado de plagas, dentro del cual se han evaluado varios agentes biocontroladores de origen fúngico como *Purpureocillium lilacinum* (Thom) Luangsa-ard, Hywel-Jones, Houbraken & Sanson (Luangsa *et al.*, 2011), *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare y Gams, *Hirsutella rhossiliensis* Minter y Brady, *Dactylella oviparasitica* Stirling y Mankau, *Arthrobotrys dactyloides* Drechsler y *Monacrosporium drechsleri* (Tarjan) Cooke y Dickinson, los cuales infectan huevos, juveniles o adultos (Agrios, 2005; Viaene *et al.*, 2006) y bacterial como *Pasteuria penetrans* (Thorne) Sayre y Starr, *P. usgae*, *Tsukamurella paurometabola* Steinhaus cepa C-924 y *Bacillus thuringiensis* Berliner cepa LBT-24, los cuales han logrado disminuir las infestaciones de fitonematodos en cultivos susceptibles a ellos como café, guayabo, plátano, tomate de cocina, papa, lulo, etc. (Agrios, 2005; Hernández & Hidalgo, 2008).

En los últimos años se han incrementado las investigaciones para determinar el potencial de los agentes de control biológico de fitonematodos, especialmente con el hongo *P. chlamydosporia*, que es un parásito facultativo de huevos; además, el hongo coloniza el rizoplano como saprótrofo hasta que infecta los huevos del nematodo y forma redes de hifas con órganos especializados que penetran la capa vitelina mediante lisis enzimática. Este hongo ha estado asociado con el control natural de *Heterodera avenae* en cultivos de cereales en Europa. También, se ha registrado como un parásito de huevos de hembras de *Meloidogyne arenaria*. Asimismo, tiene gran potencial como controlador de fitonematodos por la producción de dictioclamidiosporas (estructuras de resistencia) que le permiten una fácil manipulación, almacenamiento y una mayor supervivencia en el suelo (Leguizamón, 1999; Hidalgo *et al.*, 2004). Se ha comprobado, que la efectividad del hongo *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (cepa IMI SD 187) aumenta con el tiempo, sobre un segundo ciclo

del cultivo susceptible, aumentando su población en el suelo y mejorando paulatinamente su acción biorreguladora (Hernández & Hidalgo, 2008).

La posibilidad de cultivar a *P. chlamydosporia* en medios artificiales líquidos o sólidos (Kerry & Jaffee, 1997), su abundancia en raíces infestadas con nematodos, su fácil dispersión y colonización en la rizósfera, así como su especificidad hospedadora y virulencia (Gams, 1988; De Leij & Kerry, 1991; Morton *et al.*, 2003; Mauchline *et al.*, 2004), lo han hecho un agente de uso potencial en el control biológico de nematodos fitoparásitos (Bourne *et al.*, 1996). Otra característica importante del hongo es que puede sobrevivir en ausencia del nematodo (Flores-Camacho *et al.*, 2008).

Otro hongo agente de control biológico de nematodos fitoparásitos es *P. lilacinum*, el cual tiene gran adaptabilidad a diferentes tipos de suelo y alto potencial infectivo (Jatala, 1985). *P. lilacinum* infecta huevos y hembras de nematodos del género *Meloidogyne* spp. causando deformaciones, destrucción de huevos y limitando la eclosión del segundo estado juvenil (J2); a la vez se ha comprobado que en condiciones de pH ligeramente ácido, produce toxinas que afectan el sistema nervioso de los nematodos (Paecisav, 1997). Castaño & Franco (2002), demostraron la efectividad de *P. lilacinum* en plátano, bajo la formulación de Biostat®, en la erradicación de *Meloidogyne* spp. y reducción de poblaciones de *Radopholus similis*.

El nematodo barrenador (*R. similis*) es uno de los organismos más importantes que ataca la raíz y el rizoma (cormo) del plátano y banano en las zonas de producción inter-tropicales. La propagación vegetativa usando rizomas o hijuelos infectados ha diseminado esta plaga alrededor del mundo. *R. similis* es un nematodo endoparásito migratorio que completa su ciclo de vida en 20-25 días en los tejidos de las raíces y del cormo. La distribución de esta especie está condicionada por sus preferencias de temperatura, las que fluctúan entre 24 y 32°C. Las pérdidas causadas por *R. similis* dependen, en gran medida, de la fertilidad del suelo. En condiciones

extremas, en suelos pobres y erosionados, las pérdidas acumulativas durante tres ciclos de producción pueden alcanzar hasta 75%, debido a la reducción del peso del racimo y a la caída de las plantas como ha ocurrido en Costa de Marfil (Sarah *et al.*, 1996; Guzmán, 2011). En Colombia y Ecuador, las pérdidas causadas esencialmente por el desraizado de plantas (volcado) fluctúan entre 12 y 18% (Araya *et al.*, 2003).

A pesar de que la fumigación del suelo es bastante efectiva en eliminar los nematodos, son muy pocos los nematicidas autorizados actualmente y los costos de aplicación pueden ser prohibitivos. Más aún, los fumigantes son biocidas de amplio espectro con efectos nocivos sobre la microflora del suelo (Sarah *et al.*, 1996). Asimismo, los nematicidas son generalmente efectivos en el control de los nematodos, no son fáciles de usar, son caros, altamente tóxicos, y tienen un impacto negativo sobre el medio ambiente. Los estudios realizados en diversos cultivos han demostrado que los nematicidas de acción sistémica no son absorbidos ni transportados por un sistema radical dañado por el nematodo, y que los productos de contacto, reducen solo provisionalmente las poblaciones existentes las cuales, en la mayoría de los casos, vuelven a sus niveles iniciales haciéndose necesario aplicar de nuevo el producto (Leguizamón, 1977; Fogain, 2000). Según Arango (1977), el tratamiento nematicida debe ser preventivo ya que su acción curativa dependerá del área de la raíz infectada y de la especie del fitonematodo; cuando este se establece en los tejidos radicales altera los vasos del xilema de manera irreversible.

La selección de aislamientos de hongos biocontroladores, depende del resultado de pruebas de laboratorio e invernadero en las que se evalúe la capacidad para colonizar la rizósfera; la producción y viabilidad de las clamidosporas, la mortalidad que causan a los nematodos, la posibilidad de cultivarlo en medio artificial líquido o sólido, su abundancia en raíces infestadas con nematodos, su fácil dispersión y colonización en la rizósfera así como su especificidad hospedatoria y virulencia (Kerry & Jaffee, 1997). La

planta hospedante y las condiciones ambientales tienen un efecto significativo en el crecimiento del hongo, por lo que es preferible identificar aislamientos con potencial colonizador de la rizósfera de los cultivos locales. Otra característica importante del biocontrolador es que pueda sobrevivir en ausencia del nematodo (Flores *et al.*, 2008).

La ventaja del control biológico con hongos, radica en que tienen la capacidad de reducir paulatinamente las poblaciones del nematodo por debajo del nivel crítico, el cual depende del género de fitonematodo y del cultivo; su aplicación es compatible con los métodos empleados en los sistemas de producción intensiva y orgánica de los cultivos; se puede conservar a temperatura ambiente, en un lugar seco y fresco por un periodo de tres meses o más tiempo; no tiene acción nociva para la salud humana ni riesgo de contaminar el medio ambiente y las aguas subterráneas; no perjudica y es compatible con los organismos benéficos del suelo. Debido a lo anterior, el objetivo de esta investigación fue determinar el efecto bajo condiciones *in vitro* de *P. lilacinum* y *P. chlamydosporia* var. *catenulata* sobre *R. similis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Insumos biológicos y químicos

P. lilacinum: PI-11 cuyo producto comercial es Biostat® WP (2×10^7 conidias.g⁻¹) de categoría toxicológica III y registro ICA N° 3855 Biostat® ha sido formulado por la empresa Laverlam International Corp (Butte, Montana, Estados Unidos). *P. chlamydosporia* var. *catenulata*, formulado como polvo humectable para esta evaluación por la misma empresa arriba mencionada en una concentración de (1×10^6 conidias.g⁻¹).

El insumo químico utilizado fue carbofuran en concentración de 330 g.L⁻¹ (Carbofed® 330 SC). Este insumo viene como solución concentrada y categoría toxicológica I. Registro ICA N° 4215.

Obtención del inóculo de *R. similis*

Para la obtención de los estadios del fitonematodo (huevos, juveniles y adultos) se recolectaron raíces de plantas de plátano Dominico Hartón (*Musa AAB*) severamente parasitadas por *R. similis*, ubicadas en la granja Montelindo de la Universidad de Caldas, región de Santágueda, municipio de Palestina, departamento de Caldas, a una altitud de 1010 msnm, con precipitación anual de 2100 mm, temperatura promedio 27°C y humedad relativa promedio de 76%.

Las muestras de raíces se llevaron al Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Producción Agropecuaria de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Caldas, para realizar la extracción de *R. similis* basados en el principio de centrifugación y flotación en azúcar de los nematodos con base en la metodología descrita por Jenkins (1964) y Meredith (1973).

El procedimiento se realizó de la siguiente manera: las raíces se lavaron con agua corriente, después de dejarlas secar a temperatura ambiente, se pesaron 30 g en una balanza Analytical Plus, marca Ohaus®, y con la ayuda de un cuchillo se cortaron transversalmente trozos de raíces de 1 cm y luego se homogenizaron. Estos trozos se colocaron dentro del vaso de una licuadora Osterizer®, modelo 565-15, con 100 ml de agua y luego se licuaron en la revolución más baja por 10 s, tres veces, y cada vez se dejó reposar 10 s. Se filtró la mezcla obtenida en una columna de tamices con mallas de 710, 250, 106 y 25 μm , ubicados en esta secuencia, la muestra se lavó con agua a presión en cada tamiz para que hubiera desprendimiento de los nematodos, a excepción del tamiz de 25 μm , ya que el material que quedó en este fue recolectado en tubos de centrifugación con capacidad para 28 ml. Posteriormente, se centrifugó a 3800 rpm durante 5 min. Como consecuencia de la centrifugación hubo sedimentación de las partículas pesadas en el fondo del tubo y se procedió a eliminar el sobrenadante. Seguidamente, los tubos fueron llenados con una solución de sacarosa al 50% y sometidos nuevamente

a centrifugación a 3800 rpm durante 5 min con el propósito de que los nematodos quedaran flotando en la solución de sacarosa por densidad diferencial y fueran separados de las partículas más pesadas. Luego el sobrenadante se depositó en el tamiz de 25 μm y se lavó con agua corriente a baja presión para eliminar la sacarosa y evitar el deterioro físico de los nematodos. Finalmente se recogieron 20 ml de agua con nematodos en una caja Petri para realizar la cuantificación de los huevos, estados juveniles y adultos de *R. similis*, con ayuda de una cámara de recuento dividida en 36 celdas (6 x 6) cada una de 1 mm².

Procedimiento de inoculación de *P. lilacinum*, *P. chlamydosporia* var. *catenulata* y *R. similis*

Inicialmente, a cajas Petri estériles de 60 x 15 mm que contenían 6 ml del medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar –PDA– (DIFCO®), acidificado con ácido láctico al 88%, se les adicionó a cada una 1 ml de *P. lilacinum* en una concentración de $1,03 \times 10^8$ esporas. ml⁻¹. Igual procedimiento y concentración se hizo para *P. chlamydosporia* var. *catenulata* según el trabajo realizado por Fernández (1991).

Posteriormente, las 15 cajas Petri inoculadas con *P. lilacinum*, se dividieron en tres grupos de cinco cajas y se les adicionaron suspensiones de 30 μl conteniendo 50 huevos (tratamiento 1), 50 juveniles (tratamiento 2) y 50 adultos (tratamiento 3) de *R. similis*, respectivamente. Luego, los diferentes estadios y los hongos se incubaron a temperatura ambiente del laboratorio durante siete días, para luego evaluar la infección del hongo en cada uno de los estadios del fitonematodo. La evaluación se realizó adicionando 15 gotas de azul de lactofenol al 1% en cada caja Petri y observando al microscopio invertido (LEICA®) con los objetivos 10 y 25X. Posteriormente, se realizó el recuento de las poblaciones de los nematodos en sus diferentes estados de desarrollo y su infección, a partir de las primeras 12 h. El anterior procedimiento también se realizó para el hongo *P. chlamydosporia* (tratamientos 4, 5 y 6, respectivamente).

Para el testigo absoluto se usó agua destilada estéril para suspensiones de huevos, juveniles y adultos de *R. similis*, bajo condiciones similares a las mencionadas anteriormente (tratamientos 7, 8 y 9, respectivamente), y el testigo químico carbofuran (Carbofed® 330 SC), en solución concentrada, el cual se aplicó en dosis de 330 ppm, a suspensiones de huevos, juveniles y adultos de *R. similis*, en condiciones similares a las mencionadas arriba (tratamientos 10, 11 y 12, respectivamente). Las lecturas se tomaron cada 12 horas, durante cinco días para cada tratamiento evaluado.

La asignación de tratamientos se realizó con base en un diseño experimental completamente aleatorio, con 12 tratamientos, cada uno con cinco repeticiones, las lecturas se realizaron durante un tiempo de 120 horas, registrándose resultados cada 12 horas. La variable de respuesta fue el número (N°) de individuos infectados por cada hongo. La diferencia entre los individuos infectados y los sanos sobre el total de inoculados permitió calcular el grado de infección de cada uno de los hongos evaluados.

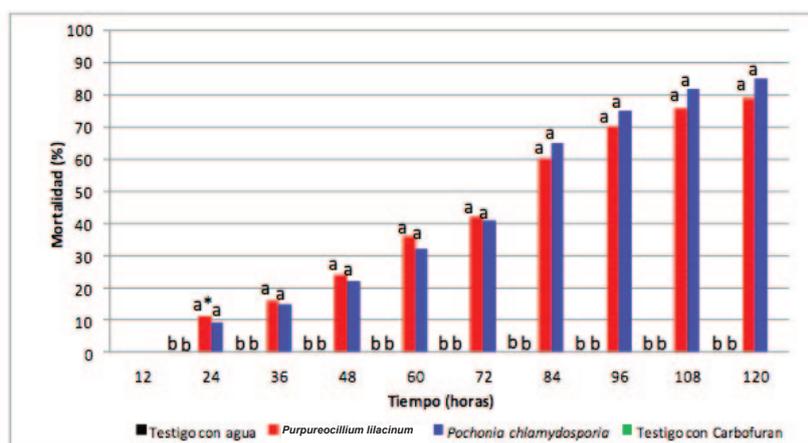
Análisis estadístico. Con los datos obtenidos se determinaron los promedios y el coeficiente de variación para la variable de respuesta. Se hizo

análisis de varianza al 5% y prueba de Tukey al 5% para establecer la diferencia entre los promedios de los tratamientos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Infección de *P. lilacinum* y *P. chlamydosporia* sobre huevos de *R. similis*

P. lilacinum y *P. chlamydosporia*, infectaron el 11 y 9%, respectivamente, de los huevos de *R. similis* a las 24 h de inoculados (Figura 1); incrementándose hasta el final de la evaluación a las 120 h con 79 y 85% de huevos infectados, respectivamente (Figura 1), encontrándose buen resultado para el control biológico por el grado y aumento de la infección a través del tiempo. Estos resultados fueron estadísticamente diferentes a los de carbofuran y agua donde no ocurrió destrucción o daño sobre los huevos (Figura 1), debido a esto se puede inferir que la composición de las capas que conforman la cubierta de los huevos, como la vitelina, la quitina y los glucolípidos no fueron alterados, y sirvieron como aislante o protección de los mismos. Estos resultados mostraron que el uso de carbofuran en el control de huevos de *R. similis* no es eficiente, y por consiguiente, es mejor la acción de los hongos.



* En cada tiempo de evaluación, las columnas seguidas por la misma letra no se diferencian significativamente, de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de Tukey al 5%.

Figura 1. Seguimiento de la infección de *Purpureocillium lilacinum* y *Pochonia chlamydosporia* sobre huevos de *Radopholus similis* desde las 12 h hasta 120 h.

En la Figura 2 se muestra el crecimiento de *P. lilacinum* y *P. chlamydosporia*, sobre huevos de *R. similis* a las 24, 48, 72, 96 y 120 h, donde se evidencia la excelente capacidad de infección de ambos hongos.

Los resultados anteriores permitieron demostrar que la concentración de $1,03 \times 10^8$ esporas.mL⁻¹, usada para ambos hongos, presentó buen efecto nematocida sobre huevos de *R. similis* en condiciones *in vitro*.

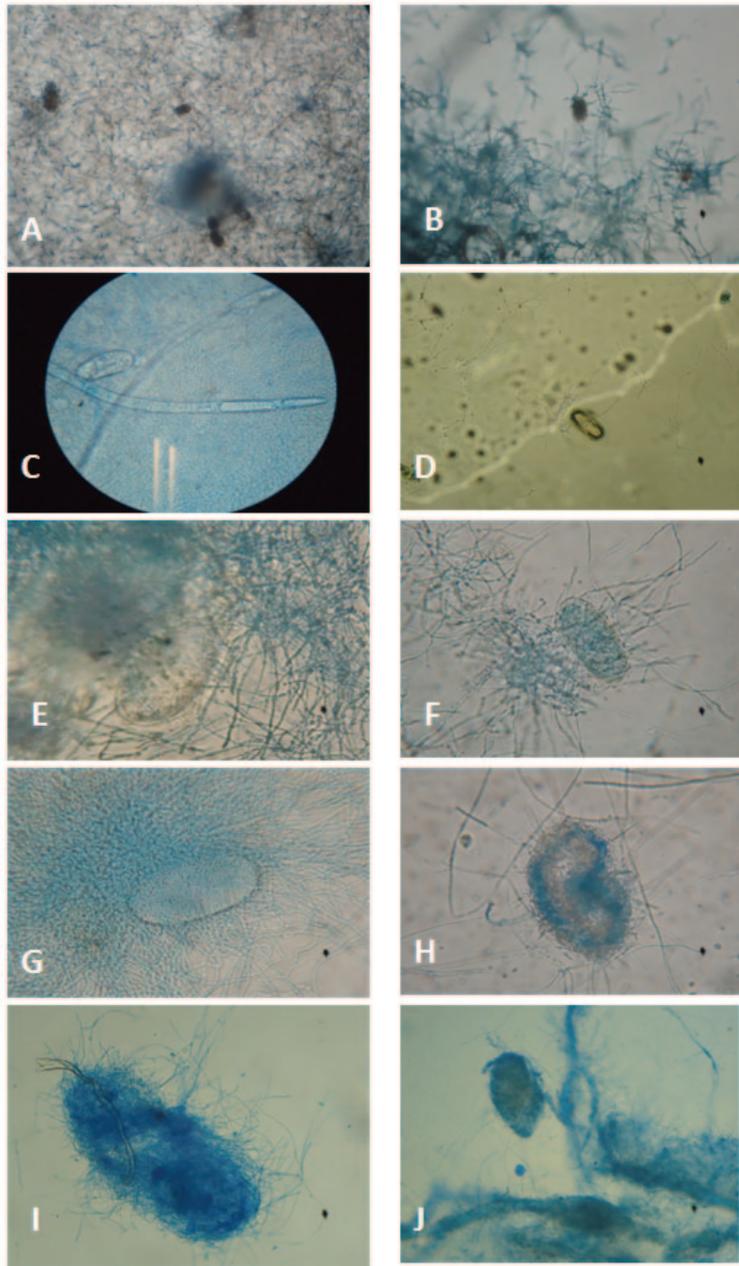


Figura 2. Crecimiento de *Purpureocillium lilacinum* (izquierda) y *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (derecha), sobre huevos de *Radopholus similis*. **A y B** 24 h. **C y D** 48 h. **E y F** 72 h. **G y H** 96 h. **I y J** 120 h.

Kerry y Bourne (2002), destacan que los tratamientos con *P. chlamydosporia* y *P. lilacinum* infectan huevos inmaduros más ágilmente que a huevos maduros, los juveniles de segundo estadio escapan a la infección a temperaturas cercanas a 30°C, porque eclosionan antes que la masa de huevos sea totalmente colonizada y los nematodos en fases móviles no son parasitados por el hongo.

Atkins *et al.* (2003), aseguran que la cepa de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* es promisoría para el manejo de huevos de nematodos fitoparásitos, demostrando una infección del 68% en huevos de *M. incognita* en condiciones semi-controladas y un 70% de las masas de huevos colonizadas sobre la rizósfera, después de seis meses de aplicado el hongo en una sucesión de cultivos. Flores *et al.* (2008) también obtuvieron resultados similares con aislamientos mexicanos de la cepa, los cuales produjeron un parasitismo superior al 60% en los huevos del nematodo *M. incognita* y una colonización del 100% de la rizósfera. En este estudio la cepa de *P. chlamydosporia* funcionó con un total de 85% de infección de huevos de *R. similis*; demostrando el poder infectivo del hongo en diferentes especies de fitonematodos.

Kerry (1982) y Gaspard (1990), identificaron a *P. lilacinum* y *P. chlamydosporia* como parásitos de huevos y su asocio con la supresión de nudos en las raíces producidos por *Globodera* spp. y *Heterodera* spp. Su potencial como agentes de control biológico se sugiere por estudios en los que las cantidades de nematodos fueron bajando entre 20-40% cuando los hongos se inocularon (Byrd, 1976). Los huevos inmaduros son más susceptibles al parasitismo por *P. chlamydosporia* que los que contienen la segunda etapa juvenil (Irving, 1986), esto se debe tener en cuenta al realizar manejo con este hongo para maximizar su capacidad de acción.

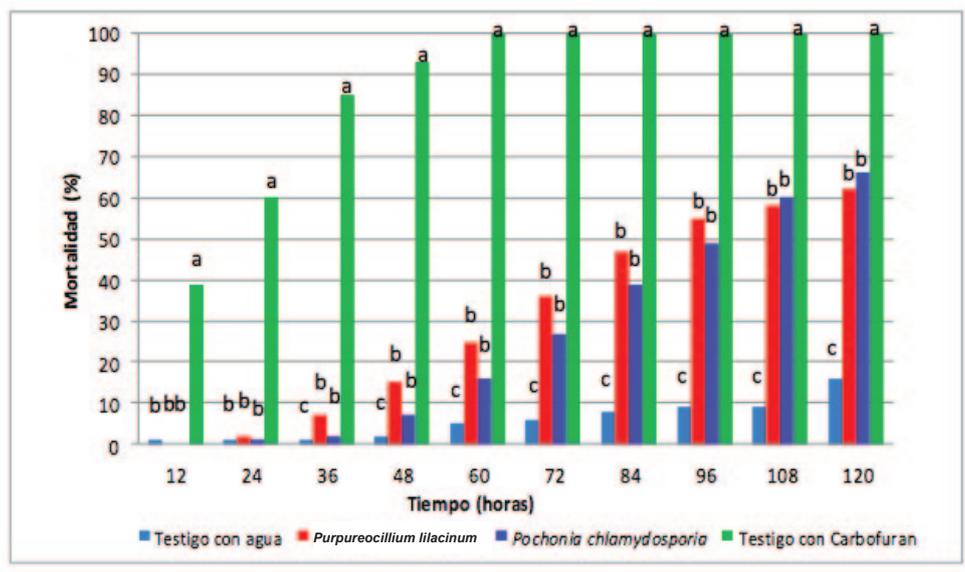
Infección de *P. lilacinum* y *P. chlamydosporia* sobre juveniles y adultos de *R. similis*

El análisis de varianza permitió determinar diferencias estadísticas entre los tratamientos con los insumos biológicos *P. lilacinum* y *P. chlamydosporia* y los testigos agua y carbofuran para la variable mortalidad de

juveniles y adultos de *R. similis* (Figuras 2 y 3). Se evidenció que la mortalidad de los estados juveniles y adultos del fitonematodo fue baja a las 12 h con valores entre 1 y 2% para *P. lilacinum* y *P. chlamydosporia*, respectivamente (Figuras 2 y 3), la cual fue creciente en la medida que transcurría el tiempo, hasta llegar a las 120 h a 62 y 66% para juveniles, respectivamente (Figura 3) y 61 y 68% para adultos, respectivamente. Los anteriores resultados fueron estadísticamente diferentes a los obtenidos con el testigo carbofuran en donde se encontró que desde las 48 h de exposición de los fitonematodos (juveniles y adultos) al químico provocó una mortalidad mayor al 90% (Figuras 3 y 4); todo lo contrario ocurrió en el testigo agua donde no hubo mortalidad, solo se registró un 16% de muerte de *R. similis* a las 120 h de evaluación (Figuras 3 y 4).

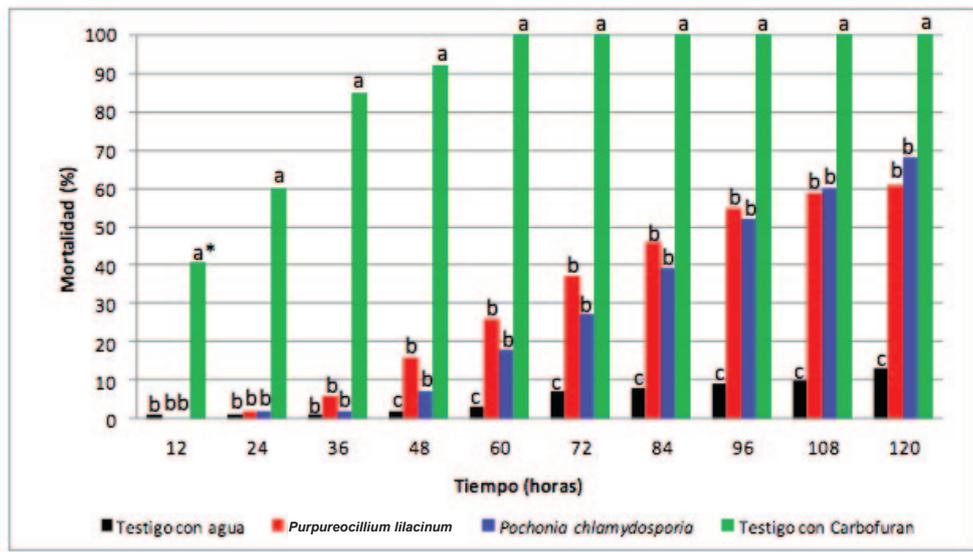
Los resultados anteriores permitieron demostrar que los tratamientos con *P. lilacinum* y *P. chlamydosporia*, en la concentración de $1,03 \times 10^8$ esporas.mL⁻¹, tuvieron un efecto nematicida sobre estados juveniles y adultos de *R. similis* en condiciones *in vitro* (Figura 5). Este comportamiento tuvo una tendencia creciente a través del tiempo de acción de ambos hongos, en relación con el tiempo de exposición de los nematodos. No obstante, estos tratamientos tuvieron menor mortalidad que el testigo químico, pero hay que destacar que el tratamiento químico con carbofuran, no fue implementado en dosis comercial recomendada por el fabricante de 240 ppm, para el control de este nematodo, sino en una dosis mayor a las 330 ppm (Arboleda *et al.*, 2010), esto demuestra que los tratamientos con los hongos tuvieron un excelente efecto sobre la mortalidad de *R. similis* durante las 120 h de evaluación.

En los diez tiempos de evaluación de los hongos *P. lilacinum* y *P. chlamydosporia*, para la variable mortalidad de juveniles y adultos de *R. similis* en condiciones *in vitro*, fueron consistentes en el tiempo, debido a que los valores fueron similares en las variables evaluadas, al igual que en los testigos (Figuras 3 y 4), mostrando una relación directa entre la mortalidad y el tiempo, ya que al aumentar el tiempo de acción de los tratamientos, la mortalidad fue mayor.



* En cada tiempo de evaluación, las columnas seguidas por la misma letra no se diferencian significativamente, de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de Tukey al 5%.

Figura 3. Seguimiento de la infección de *Purpureocillium lilacinum* y *Pochonia chlamydosporia* sobre juveniles de *Radopholus similis* desde las 12 h hasta 120 h.



* En cada tiempo de evaluación, las columnas seguidas por la misma letra no se diferencian significativamente, de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de Tukey al 5%.

Figura 4. Seguimiento de la infección de *Purpureocillium lilacinum* y *Pochonia chlamydosporia* sobre adultos de *Radopholus similis* desde las 12 h hasta 120 h.

El crecimiento de ambos hongos bajo condiciones *in vitro*, manifestó un comportamiento creciente a través del tiempo, mostrando su máximo potencial a las 120 h (Figura 5), sin embargo para el caso de *Purpureocillium lilacinum* se obtuvo un porcentaje de mortalidad superior que el de *P. chlamydosporia* hasta las 96 h en la variable juveniles y en la variable adultos, y para el tratamiento con *P. chlamydosporia* se obtuvo un porcentaje de mortalidad superior al de *P. lilacinum* a partir de las 108 h en la variable juveniles

y en la variable adultos; y para ambas variables el número de esporas a las 120 h de evaluación, fue superior para *P. chlamydosporia* con un promedio de 21'150.000 esporas.mL⁻¹ mientras que para *P. lilacinum* fue de 13'650.000 esporas.mL⁻¹; esto quiere decir que la tasa de mortalidad y el crecimiento de *P. lilacinum* es superior al de *P. chlamydosporia*, las primeras 96 h, pero la tasa de mortalidad y el crecimiento de *P. chlamydosporia* es superior al de *P. lilacinum* a partir de las 108 h.

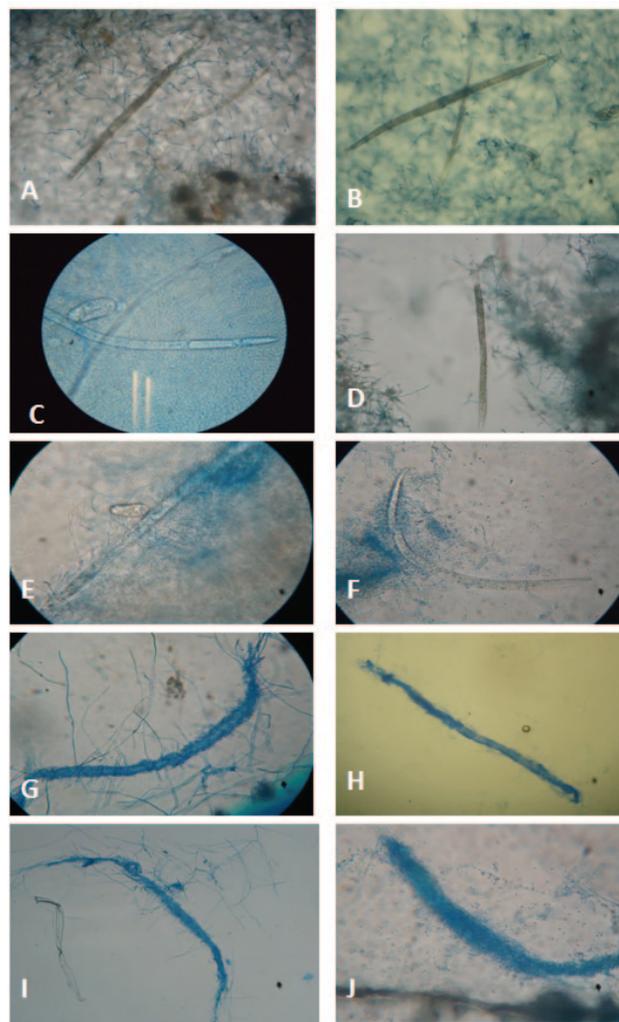


Figura 5. Crecimiento de *Purpureocillium lilacinum* (izquierda) y *Pochonia chlamydosporia* (derecha), sobre estados juveniles y adultos de *Radopholus similis* en diferentes tiempos: **A y B** 24 h. **C y D** 48 h. **E y F** 72 h. **G y H** 96 h. **I y J** 120 h.

Para el testigo agua, la baja recuperación de juveniles y adultos, puede explicarse por la pérdida de movilidad del nematodo con el transcurso de los días, la cual es influenciada por factores como temperaturas altas, pérdida de humedad del sustrato, ausencia del material vegetal susceptible a ser infectado o presencia de compuestos orgánicos e inorgánicos en el medio; también, la ausencia de un sustrato susceptible de ser parasitado tiene gran influencia en la movilidad en los nematodos a largo plazo, ya que estos responden favorablemente a los estímulos químicos provenientes de las raíces de la planta hospedante; ante esta situación, la actividad o movilidad del nematodo disminuye, para conservar sus pocas reservas ya que en esta etapa de desarrollo no tiene actividad alimenticia (Mauchline *et al.*, 2004).

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en los trabajos realizados por Kerry *et al.* (1993), quienes registran marcadas diferencias entre tratamientos según su patogenicidad; de igual manera, es de gran importancia tener en cuenta al utilizar un tratamiento *in vitro*, las referencias bibliográficas de otros autores, quienes explican cómo las pruebas *in vitro* solo sirven para preseleccionar aislamientos y no para medir su nivel de competencia con otros microorganismos del suelo, o para evaluar la capacidad de colonización de huevos en condiciones naturales.

Los métodos desarrollados hasta el presente, tienen la limitante de no poder informar sobre el estado fisiológico del hongo y de no ser específicos para detectar aislamientos de la variedad catenulata de *P. chlamydosporia*, por lo cual se necesita profundizar en el estudio de estas técnicas antes de ser usadas como instrumentos para la caracterización y detección de diferentes aislamientos de este hongo. Para caracterizar su potencial en el suelo, se necesita conocer su relación cuantitativa respecto a la rizósfera de la planta y al fitonematodo (Gams, 1988). La estimación de los cambios en la densidad del hongo precisa de técnicas de extracción física de clamidosporas del suelo (Kerry, 1982) y de la estimación del número total de propágulos en el suelo o en raíz (Kerry *et al.*, 1993).

Godoy (1983), reconoce que el efecto de *P. chlamydosporia* es tan eficaz como el de *P. lilacinum* en el control del nematodo *M. arenaria* en estados adultos; en esta investigación con el nematodo *R. similis*, fue superior el control ejercido por *P. chlamydosporia* frente al de *P. lilacinum*, a través del tiempo, en todos los estados de desarrollo del nematodo.

CONCLUSIONES

La inoculación de *P. lilacinum* y *P. chlamydosporia* en la concentración de $1,03 \times 10^8$ esporas.mL⁻¹ sobre huevos, juveniles y adultos de *R. similis* en condiciones *in vitro*, aumentó progresivamente el número de individuos infectados desde las 12 hasta las 120 horas en los tres estadios del fitonematodo, convirtiéndose en una alternativa promisoriosa para su control, la cual deberá ser validada en condiciones de campo dentro de un manejo integrado, para facilitar las labores agrícolas y permitirle al sector rural implementar alternativas respetuosas con el medio ambiente y a su vez económicas en la producción.

Se deben realizar nuevas investigaciones relacionadas con la interacción de ambos hongos con otros organismos benéficos del suelo; asimismo, la compatibilidad que pueden tener estos, con agroquímicos, empleados en las prácticas agrícolas del cultivo del plátano. De igual forma, se deben hacer nuevas selecciones y búsquedas de aislamientos de ambos hongos, en los diversos pisos térmicos, suelos y regiones del país, que contribuyan a la disposición de ceparios amplios, con los cuales contrastar la información obtenida en los ensayos e investigaciones.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan los más sinceros agradecimientos a la empresa Laverlam International Corp. por el aporte de las formulaciones de los hongos controladores de nematodos fitoparásitos y por el apoyo económico para poder realizar esta investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrios, G. 2005. Plant pathology. 5 edición. Elsevier Academic Press, Nueva York. 992p.
- Arango B., L. G. 1977. Estudio del proceso infectivo y la histopatología del complejo de nematodos *Meloidogyne incognita* - *Meloidogyne javanica* sobre plantas del cafeto. Tesis Magíster Science. Universidad Nacional – ICA, Bogotá.
- Araya, M., Centeno, M. & Carrillo, W. 2003. Densidad poblacional y frecuencia de los nematodos parásitos de banano (*Musa* AAA) en nueve cantones de Costa Rica. CORBANA. 20(43):6-11.
- Arboleda, F. de J., Guzmán, O. A. & Restrepo, J. F. 2010. Efecto de extractos acuosos de higuera (*Ricinus communis* L.) sobre el nematodo barrenador [*Radopholus similis* (Cobb) Thorne]. Revista Agronomía. 18(2):25-36.
- Atkins, S. D., Hidalgo, L., Kalisz, H., Muchline, T. H., Hirsch, P. R. & Kerry, B. R. 2003. Development of a new management strategy for the control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in organic vegetable production. Pest Manag. Sci. 59:183-189.
- Byrd, D. W. 1976. Two semi-automatic elutriators for extracting nematodes and certain fungi from soil. Journal of Nematology. 8:206-212.
- Bourne, J. M., Kerry, B. R. & De Leij, F. A. A. M. 1996. The importance of the host plant on the interaction between root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and the nematophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium* Goddard. Biocontrol Science and Technology. 6:539-548.
- Castaña, J. & Franco, G. N. 2002. Evaluación de alternativas para el manejo de nematodos en plátano dominico hartón. Fitotecnia, Manizales. 68:2.
- Flores–Camacho, R., Atkins, S., Manzanilla–López, R., Del Prado–Vera, I., & Martínez–Garza, A. 2008. Caracterización de Aislamientos Mexicanos de *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (Goddard) Gams y Zare para el Control Biológico de *Nacobbus aberrans* (Thorne) Thorne y Allen. Rev. Mex. Fitopatol. 26 (2):93-104.
- De Leij, F. A. A. M. & Kerry, B. R. 1991. The nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* Goddard, as a potential biological control agent for *Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood. Revue de Nématologie. 14:157-164.
- Fernández, E. 1991. Efectividad *in vitro* del hongo *Paecilomyces lilacinum* como control biológico de *Meloidogyne incognita*. Revista Protección Vegetal. 4(1):66-70.
- Flores, C. R., Atkins, S. D., Manzanilla-López, R. & Prado-Vera, I. C. 2008. Caracterización de aislamientos mexicanos de *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Gams y Zare para el control biológico de *Nacobbus aberrans* (Thorne) Thorne y Allen. Revista Mexicana de Fitopatología. 26(2):93-104.
- Fogain, R. 2000. Effect of *Radopholus similis* on plant growth and yield of plantains (*Musa*, AAB). Nematology. 2(2):129-133.
- Gams, W. 1988. A contribution to the knowledge of nematophagous species of *Verticillium*. Netherland Journal of Plant Pathology. 94:123-148.
- Gaspard, J. T. 1990. Association of *Verticillium chlamydosporium* and *Paecilomyces lilacinum* with Root-knot Nematode Infested Soil. Journal of Nematology. 22(2):207-213.
- Godoy, G. 1983. Fungal parasites of *Meloidogyne arenaria* eggs in an Alabama soil. A mycological survey and greenhouse studies. Nematropica. 13:201-213.
- Guzmán, Ó. A. 2011. El nematodo barrenador (*Radopholus similis* [COBB] THORNE) del banano y plátano. Revista Luna Azul. 33:137-153.

- Hernández, M. A. & Hidalgo, L. 2008. KlamiC®: bionematicida agrícola producido a partir del hongo *Pochonia chlamydosporium* var. *catenulata*. Revista. Protección Vegetal. 23(2):131-134.
- Hidalgo, L., Montes De Oca, N., Correa, H. & Hernández, M. A. 2004. Manual para la investigación y desarrollo de un Bionematicida a partir de la cepa Vcc-108 de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*. CENSA, OCIC.
- Irving, F. 1986. Variation between strains of the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* Goddard. II. Factors affecting parasitism of cyst nematode eggs. Nematologica. 32:474-485.
- Jatala, P. 1985. Biological control of nematodes. pp. 303-308. In: Sasser, J. N. & C. C. Carter (eds.). An Advanced Treatise on *Meloidogyne*. Volume 1. North Carolina State.
- Jenkins, W. R. 1964. A rapid centrifugal flotation technique for extracting nematodes from soil. Plant Dis. Rep. 48:692. (Dept. Entomology and Economic Zoology, Rutgers University, New Brunswick, NJ).
- Kerry, B. R. 1982. Natural control of the cereal cyst nematode, *Heterodera avenae* Woll. by soil fungi at three sites. Crop Protection. 1:99-109.
- Kerry, B. R. & Jaffee, B. A. 1997. Fungi as biological control agents for plant parasitic nematodes. The Mycota. 4:203-218.
- Kerry, B. R. & Bourne, J. (eds.). 2002. A manual for research on *Verticillium chlamydosporium* a potential biological control agent for root-knot nematodes. University of Reading, UK. IOBC/WPRS, OILB/SROP, Gent.
- Kerry, B. R., Kirkwood, I. A., De Leij, F. A. A. M., Barba, J., Leidjens, M. B. & Brookes, P. C. 1993. Growth and survival of *Verticillium chlamydosporium* Goddard, a parasite of nematodes in soil. Biocontrol Science and Technology. 3:355-365.
- Leguizamón, J. E. 1977. Evaluación de nematicidas para el control de *Meloidogyne exigua* Goeldi, en plántulas de *Coffea arabica* var. Caturra. Cenicafé. 28(3):108-116.
- Leguizamón, J. E. 1999. Efecto de *Pochonia chlamydosporia* en el control de *Meloidogyne* spp., en almácigos de café, var. Caturra. Cenicafé. 50(4):286-298.
- Luangsa-Ard, J., Houbraken, J., Van Doorn, T., Hong, SB, Borman, A. M., Hywel-Jones, N.L. & Samson, R.A. 2011. “*Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*”. *FEMS Microbiology Letters* 321 (2): 141–9.
- Mauchline, T. H., Kerry, B. R. & Hirsch, P. 2004. The biocontrol fungus *Pochonia chlamydosporia* shows nematode host preference at the infraspecific level. Mycological Research. 108:161-169.
- Meredith, J. 1973. Algunos métodos de campo y laboratorio para trabajar con nematodos. Maracaibo (Venezuela). 44p.
- Morton, C. O., Mauchline, T. H., Kerry, B. R. & Hirsch, P. 2003. PCR-based DNA fingerprinting indicates host-related genetic variation in the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*. Mycological Research. 107:198-205.
- Paecisav.1997. Boletín técnico. Nematicida biológico. INISAV. La Habana, Cuba.
- Sarah, J. L., Pinochet, J. & Stanton, J. 1996. El nematodo barrenador del banano *Radopholus similis* COBB. Plagas de Musa - Hoja Divulgativa No. 1.
- Viaene, N., Coyne, D. & Kerry, B. 2006. Biological and Cultural Management. Chapter 14. Crop Protection Department, Agricultural Research Centre, Burg. Van Gansberghelaan 96, B9820 Merelbeke, Belgium; International Institute of Tropical Agriculture (IITA), PMB 5320, Oyo Road, Ibadan, Nigeria; Nematode Interactions Unit, Rothamsted Research, Harpenden, Hertfordshire AL5 2JQ, UK.