

# Evaluación microbiológica y patogenicidad de una bioformulación líquida del hongo *Purpureocillium* sp. (cepa UdeA 0109) sobre estadios de *Meloidogyne incognita-javanica*

✉ Nadya Lorena Cardona, David Andrés Borrego, Erika Pamela Fernández, Jessika Sánchez, Valentina Cardona, Gabriel Montoya

Grupo de Biocontrol y Microbiología Ambiental, BIOMA  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Instituto de Biología, Universidad de Antioquia  
Calle 67 No. 53-108, Medellín, Colombia  
✉ nadya.cardona@udea.edu.co; nadyaloren@gmail.com

## RESUMEN

El Grupo de Biocontrol y Microbiología Ambiental (BIOMA) cuenta con una formulación industrial líquida del hongo *Purpureocillium* sp. (cepa UdeA 0109), desarrollada de conjunto con la casa comercial Laverlam S.A. (Cali, Colombia). En la presente investigación se evaluaron la viabilidad y la pureza del producto a diferentes temperaturas de almacenamiento, así como el potencial biocontrolador *in vitro* y en condiciones de invernadero. Los resultados de viabilidad mostraron cómo las estructuras infectivas no se afectaron por los tiempos de evaluación ni por las temperaturas de almacenamiento. Los estudios también mostraron cómo la pureza del bioformulado bajo las mismas condiciones, se mantuvo por encima del 99 %, y además se corroboró su patogenicidad *in vitro* con una  $CL_{50}$  de  $10^4$  conidias/mL. Las evaluaciones en invernadero demostraron la propiedad de afectación de los huevos del complejo *Meloidogyne incognita-javanica* así como la disminución de los estadios jóvenes con una concentración de  $10^8$  conidias/mL en tres pruebas, con distintas aplicaciones y tiempos de aplicación.

**Palabras clave:** hongos biocontroladores, *Purpureocillium* sp., *Meloidogyne incognita-javanica*

*Biotecnología Aplicada* 2014;31:204-209

## ABSTRACT

**Microbiological evaluation and pathogenicity of a liquid bioformulation of the fungus *Purpureocillium* sp. (strain UdeA 0109) on *Meloidogyne incognita-javanica* stages.** The BIOMA research group (Biocontrol and environmental microbiology) has an industrial liquid formulation based on *Purpureocillium* sp. (UdeA 0109 strain), developed with the collaboration of Laverlam S.A., a Colombian (Cali) commercial house. In the present study the researchers tested the viability and the purity at different storage temperatures as well as its biological potential both *in vitro* and under greenhouse conditions. The results of viability showed how the infective structures were affected neither by the evaluation time nor by the storage temperatures. Studies also showed that the purity of the bioformulation in the same conditions was over 99 %, and its pathogenicity *in vitro* with an  $LC_{50}$  of  $10^4$  conidia/mL was corroborated. The greenhouse tests showed the ability to produce damages in eggs of the *Meloidogyne incognita-javanica* complex, and a decreasing of the J2 stages at a concentration of  $10^8$  conidia/mL in three tests performed with a different number of applications and at different times each.

**Keywords:** Biocontrol fungus, *Purpureocillium* sp., *Meloidogyne incognita-javanica*

## Introducción

Una de las plagas que más daño causa a los cultivos y la economía es el nematodo nodulador *Meloidogyne* spp. Infesta más de 3000 especies de plantas hortícolas, frutales, cereales y ornamentales [1], deteriora sus raíces, lo que lleva a la disminución de sus nutrientes, y ocasiona considerables pérdidas económicas en los cultivos. Para su control, generalmente se usan productos químicos, lo que representa el aumento de los costos de producción, la contaminación del agua, los suelos y la compra de productos comerciales. Por tales razones, actualmente se trabaja en el manejo integrado de plagas y enfermedades (MIPE), con métodos alternativos al uso de productos químicos, como el empleo de hongos biocontroladores. Estos se han formulado en varias presentaciones, con el fin de mejorar su acción en el campo, y facilitar su uso y aplicación por el agricultor.

Las formulaciones compuestas por hongos se elaboran mediante la mezcla de sus estructuras infectivas

o metabolitos con determinados compuestos, con el fin de darle estabilidad a su ingrediente activo. Una adecuada formulación debe permitir su almacenamiento prolongado, y una pérdida mínima de las cualidades del producto, como su patogenicidad, viabilidad y estabilidad en el tiempo [2, 3]. Hay varios hongos biocontroladores con propiedades nematocidas, que afectan los los huevos y los estadios juveniles (J2) de los nematodos. Entre ellos se encuentra *Purpureocillium lilacinum* [4, 5].

En el grupo de Biocontrol y Microbiología Ambiental (BIOMA), de la Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, se logró aislar del suelo un hongo biocontrolador de nematodos, perteneciente al género *Purpureocillium*, cuya especie está en estudio. Por su potencial biocontrolador, se ha desarrollado un proceso de bioformulación industrial en presentación líquida, que se está evaluando a partir de varios parámetros y contiene como ingrediente activo

1. Abad P, Favery B, Rosso MN, Castagnone-Sereno P. Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction. *Mol Plant Pathol.* 2003;4(4):217-24.

2. Batista FA, Alves SB, Alves LFA, Pereira RM, Augusto NT. Formulação de entomopatogénos. In: *Controle Microbiano de Insetos*. 2 ed. São Paulo: FEALQ; 1998. p. 917-66.

3. Vélez A, Posada F, Marín, P, González G, Osorio VE, Bustillo P. Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatogénos. *Bol Téc Cenicafé.* 1997;17:1-37.

4. Luangsa-Ard J, Houbraeken J, van Doorn T, Hong SB, Borman AM, Hywel-Jones NL, et al. *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paeclomyces lilacinus*. *FEMS Microbiol Lett.* 2011;321(2):141-9.

el hongo *Purpureocillium* sp. cepa UdeA 0109. Este trabajo forma parte de una investigación conjunta del grupo BIOMA y la empresa Laverlam S.A. (Cali, Colombia). El objetivo fue determinar la viabilidad del hongo *Purpureocillium* sp. (Cepa UdeA 0109) sobre el complejo *Meloidogyne incognita-javanica* en diferentes momentos y temperaturas de almacenamiento, así como la patogenicidad *in vitro* y en condiciones de invernadero [6, 7].

## Materiales y métodos

El trabajo se desarrolló en dos fases. La primera correspondió a la evaluación del efecto en condiciones de laboratorio de la formulación de *Purpureocillium* sp. (Cepa UdeA 0109) sobre el complejo *Meloidogyne incognita-javanica*, y la segunda, la protección de plántulas de tomate frente a la acción del nematodo en condiciones de invernadero. El proyecto se ejecutó en las instalaciones del grupo BIOMA en el Instituto de Biología y en el Laboratorio de Biología, seccional Oriente de la Universidad de Antioquia (Rionegro, Colombia). Para el proceso experimental se utilizó una formulación líquida comercial, cuyo ingrediente activo correspondió a la cepa UdeA 0109 suministrada por el laboratorio BIOMA a la empresa Laverlam S.A. (Cali, Colombia). El biorreactor se escaló en la casa comercial, con la información suministrada por el grupo BIOMA, cuyo contenido está firmado por las dos entidades en el acuerdo de confidencialidad No. 8802-03-2010.

## Evaluación en laboratorio

### Determinación de porcentaje de germinación y pureza

El comportamiento de las estructuras del hongo de la formulación se determinó mediante pruebas relacionadas con la germinación y la conservación de la pureza en diferentes condiciones y momentos [3]. Las temperaturas evaluadas fueron: 4-8, 14, 23-25 y 30 °C. Cada una se evaluó en cuatro tiempos: 8, 15, 30 y 90 días. Se determinó la concentración inicial de las estructuras (conidias/mL), y la formulación se dispuso en tubos de 1.5 mL, que se almacenaron por duplicado en las condiciones descritas. Posterior a los tiempos de evaluación, se hicieron diluciones seriadas, para sembrar alícuotas de 5 µL en placas de Petri que contenían agar-agua, a partir de la dilución 1/1000. Se utilizaron dos placas de Petri por cada tubo y se incubaron durante 24 horas, a 23-25 °C. Luego se tomaron fragmentos del agar inoculado con el formulado, se tiñeron con azul de lactofenol y se observaron al microscopio de luz, con una magnificación de 40×. Para la determinación de la germinación, se calculó la proporción de conidias germinadas y no germinadas. Se consideraron como conidias germinadas aquellas cuyo tubo germinativo superaba como mínimo dos veces el diámetro de la conidia.

Para la determinación del porcentaje de pureza, se trabajaron las mismas temperaturas y tiempos de almacenamiento que en las pruebas de germinación. Se tomaron 100 µL de las diluciones con 10<sup>-3</sup> y 10<sup>-4</sup> conidias/mL y se sembraron en placas de agar de papa y dextrosa (Merck®), por duplicado. Posterior a su incubación durante una semana, se calculó el porcentaje de pureza (% P) en base a la relación de unidades

formadoras de colonias (u.f.c.), de acuerdo con la fórmula: % P = u.f.c. del hongo evaluado / u.f.c. totales × 100.

La unidad experimental consistió en los tubos que contenían la formulación, cada uno con cinco repeticiones. Como control se utilizó una suspensión del hongo sin formular, en agua destilada estéril, sometida a las mismas condiciones que la formulación. Se establecieron diferencias entre tratamientos mediante un Anova (p = 0.05), y se aplicó la prueba de comparación múltiple de Tukey. En aquellos casos en los cuales los datos no cumplieron los supuestos estadísticos, se hicieron transformaciones seno y arcoseno, y se aplicó el test Wilcoxon. Debido a que no hubo variabilidad entre los tratamientos en las condiciones evaluadas, en las pruebas de pureza solo se hicieron análisis descriptivos.

### Evaluación de la patogenicidad *in vitro* sobre huevos del complejo *Meloidogyne* spp.

Las pruebas de patogenicidad se hicieron con la formulación almacenada durante dos meses en el laboratorio BIOMA de la Universidad de Antioquia, a temperatura ambiente promedio (23-25 °C).

A partir de los nematodos multiplicados en condiciones de invernadero, se obtuvieron huevos del complejo *Meloidogyne* spp. Estos se extrajeron mediante la técnica del NaOCl al 5 % [6]. Se lavaron con el antibiótico oxitetraciclina® al 5 % durante 10 min, y luego se enjuagaron con agua corriente estéril, para conservarlos en nevera (4-8 °C) hasta el momento de la prueba. La suspensión de los huevos se diluyó hasta una concentración de 200 huevos/mL, que se usaron para el estudio.

Se tomaron alícuotas de 1 mL de huevos y 4 mL del hongo de las concentraciones a evaluar, que se recogieron en placas de Petri de 5 cm de diámetro, se incubaron a temperatura ambiente (25-28 °C) y se evaluaron a los 5 días. Como controles se utilizaron huevos suspendidos solamente en agua destilada estéril, y huevos suspendidos en el hongo sin bioformular. La unidad experimental fue la placa de Petri, y se evaluaron 5 tratamientos (10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>7</sup> y 10<sup>8</sup> conidias/mL) de la bioformulación almacenada a temperatura ambiente (23-25 °C) luego de 90 días, cada una con cinco repeticiones. La variable evaluada fue el porcentaje de afectación morfológica de los huevos por unidad experimental. Se utilizó un diseño al azar. Las diferencias significativas se determinaron mediante Anova (p = 0.05) y se aplicó el estadístico de comparación de medias de Tukey. Los huevos afectados se tiñeron con azul de lactofenol y se fotografiaron en un microscopio (Olympus, modelo BX 60-F5), con un aumento de 40×.

## Evaluación en invernadero

### Determinación de la permanencia del hongo en suelo

Con el fin de establecer las frecuencias en las que el hongo debía ser aplicado, fue necesario conocer la permanencia en el tiempo del hongo *Purpureocillium* sp. (Cepa UdeA 0109) en el suelo, para lo cual se utilizaron nueve vasos plásticos de 300 mL. En cada uno se adicionaron 114.5 g de suelo seco esterilizado. Posteriormente, se inoculó con 10 mL de la cepa

5. Hewlett TE, Dickson DW, Mitchell DJ, Kannwischer-Mitchell ME. Evaluation of *Paecilomyces lilacinus* as a biocontrol agent of *Meloidogyne javanica* on Tobacco. *J Nematol.* 1988;20(4):578-84.

6. Sánchez JY. Estudio de viabilidad de las estructuras del hongo *Purpureocillium* sp. cepa UdeA0109 formulado en un ingrediente inerte bajo diferentes condiciones de tiempo y temperatura. Trabajo de grado para optar por el Título de Biólogo. Universidad de Antioquia. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Seccional oriente - Carmen de Viboral. Grupo BIOMA. Universidad de Antioquia; 2013.

7. Cardona HV, Montoya TGJ. Evaluación de la patogenicidad del bioformulado de esporas de *Purpureocillium* spp. (Cepa UdeA 0109) sobre poblaciones de *Meloidogyne* spp. en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) bajo condiciones de invernadero. Trabajo de pregrado para optar por el título de Biólogo. Medellín (Colombia). Grupo BIOMA. Universidad de Antioquia; 2013.

UdeA 0109, tres vasos con cada concentración ( $10^3$ ,  $10^5$  y  $10^8$  conidias/mL).

Tras cinco días de incubación, se tomaron muestras de 5 g de suelo de cada uno de los vasos, a intervalos de 5 días: días 5, 10, 15 y 20. En cada tiempo se realizaron diluciones seriadas, y a partir de la concentración  $10^{-4}$  conidias/mL, se sembraron 100  $\mu$ L de agar de papa y dextrosa acidificado en placas de Petri en superficie, por duplicado. Posteriormente se incubaron durante 7 días entre 25 y 28 °C, para determinar el número de u.f.c./g. A partir de estos resultados se hizo un análisis descriptivo y se estableció el tiempo de aplicación del hongo para la prueba de patogenicidad en condiciones de invernadero.

Las condiciones de humedad, requeridas tanto para el establecimiento del hongo como para la supervivencia del nematodo (70 %), se establecieron mediante el cálculo de la máxima capacidad de retención de humedad del suelo [8].

#### **Determinación de la mejor concentración del formulado para disminuir los estadios jóvenes de *Meloidogyne* spp. en invernadero**

El ensayo se hizo en el invernadero de la Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, que conservaba una temperatura promedio de 26 °C. El suelo se esterilizó en autoclave y posteriormente se secó dentro del invernadero, hasta disminuir la humedad por debajo del 50 %. Para la primera inoculación de la formulación proporcionada por la casa comercial, se dispuso un recipiente plástico de 100 L de capacidad, al que se añadieron 16.8 kg de suelo correspondientes al sustrato de 21 plantas, y posteriormente se adicionaron 840 mL de la solución de esporas, para lograr una humedad del 70 %. Se aplicó el inóculo inicial de los tratamientos, se mezcló manualmente e incubó durante 24 h para el establecimiento del hongo. Pasado este tiempo, se adicionaron 800 g de la mezcla del suelo con el hongo, en bolsas plásticas de 30  $\times$  25 cm e incubó otras 24 h. Posteriormente, se hizo el trasplante de las plántulas de tomate, para inocular 3000 huevos/5 mL de *Meloidogyne* spp. alrededor del tallo de cada una.

#### **Extracción de estadios juveniles y huevos de *Meloidogyne* spp. para la determinación de poblaciones**

Para la extracción de los nematodos en estadios juveniles, se utilizó el método del tamiz papel facial [9]. Se utilizaron tamices de 10 cm de altura por 17 cm de diámetro (Kleenex®) y una malla plástica con poros de 0.4 cm. El suelo se homogenizó y se tomaron 100 g, los cuales se adicionaron en cada uno de los tamices que contenían un Kleenex® doble. Los tamices se colocaron sobre platos desechables que contenían agua corriente, lo que aseguraba que el suelo quedara humectado. Posterior a las 48 h, se recuperaron y concentraron en 100 mL los estadios juveniles, para su posterior conteo con la ayuda de un microscopio óptico invertido (Nikon Eclipse TS 100). Para la extracción de los huevos, se tomaron las raíces de cada planta. Se cortaron finamente y depositaron en frascos de vidrio que contenían 50 mL de NaOCl al 3 %. La suspensión se agitó a 180 rpm durante 15 min, y se filtró a través de una malla de tela tipo monofilamento y a continuación tamizada

por un juego de tamices de 0.125 y 0.025 mm. Luego se lavó con abundante agua para quitar el exceso de hipoclorito. Los huevos se contaron de la misma forma que los estadios juveniles.

El ensayo consistió en tres pruebas, cada una con seis tratamientos, correspondientes a las concentraciones del formulado (102, 103, 105, 107 y 108 conidias/mL y el grupo control). Los controles tenían suelo con plantas inoculadas con huevos, pero sin la aplicación de la formulación. Cada tratamiento tuvo siete repeticiones para un total de 42 plantas por prueba. Después del inóculo inicial, se hicieron aplicaciones cada 15 días con las concentraciones correspondientes, utilizando 40 mL del hongo. De esta forma, un primer ensayo comprendió tres aplicaciones, con el estudio de las poblaciones de nematodos J2 y los huevos a los 45 días (1.5 meses); en el segundo se hicieron cinco aplicaciones y el análisis a los 75 días (2.5 meses); mientras que en un tercero se inculó con siete aplicaciones de la formulación, para su posterior análisis a los 105 días (3.5 meses). Los tratamientos se dispusieron dentro del invernadero. Cada prueba se separó entre sí, con una distribución aleatoria de las plantas. Durante el estudio, la humedad se ajustó al 70 %, cada 48 h. La unidad experimental fue la planta tratada con la concentración del bioformulado de *Purpureocillium* sp. evaluado y la solución de huevos de *Meloidogyne* spp. Las variables evaluadas fueron el número de estadios juveniles/100 g de suelo y el número de huevos/100 g de raíz. Se hizo un análisis no paramétrico de Wilcoxon para establecer diferencias entre los tratamientos y su respectivo control ( $p = 0.05$ ), con ayuda del paquete estadístico R (R Project, versión 2.12.2).

## **Resultados y discusión**

### **Evaluación en laboratorio**

#### **Germinación y pureza a diferentes temperaturas y tiempos de almacenamiento**

La concentración de la formulación correspondió a  $3.6 \times 10^8$  conidias/mL. De acuerdo con el test de Wilcoxon, durante los días 0, 8 y 15 no hubo diferencias significativas entre los controles y los tratamientos ( $p \geq 0.05$ ). Sin embargo, de acuerdo con el test de Kruskal-Wallis, en el día 8 se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. Los mejores porcentajes de germinación (90 %) correspondieron a la temperatura ambiente: 23-25 °C y a la temperatura de invernadero: 4-8 °C (Figura 1A). A los 15 días hubo diferencias entre los tratamientos a temperatura ambiente (75 % de germinación) y a temperatura del Oriente Antioqueño (80 % de germinación) (Figura 1B). El día 30 no se evidenciaron diferencias entre los tratamientos, y la germinación se conservó entre el 75 y el 80 % (Figura 1C). En la lectura final (día 90), la germinación se mantuvo entre el 85 y el 90 % en todas las temperaturas, aspecto deseable en una formulación comercial (Figura 1D). Esto se ha reportado para otros hongos como *Beauveria bassiana*, que en una formulación en aceite surfactante han mostrado un incremento de la tolerancia a temperaturas elevadas, conservado la virulencia y mantenido la viabilidad de los conidios en el tiempo [9].

8. Margesin R, Schinner F. Manual for soil analysis - Monitoring and assessing soil bioremediation. Soil Biology Vol. 5. Berlin: Springer; 2005.

9. Coyne DL, Nicol JM, Claudius-Cole B. Practical plant nematology: a field and laboratory guide. SP-IPM Secretariat. Cottonou: International Institute of Tropical Agriculture (IITA); 2007.

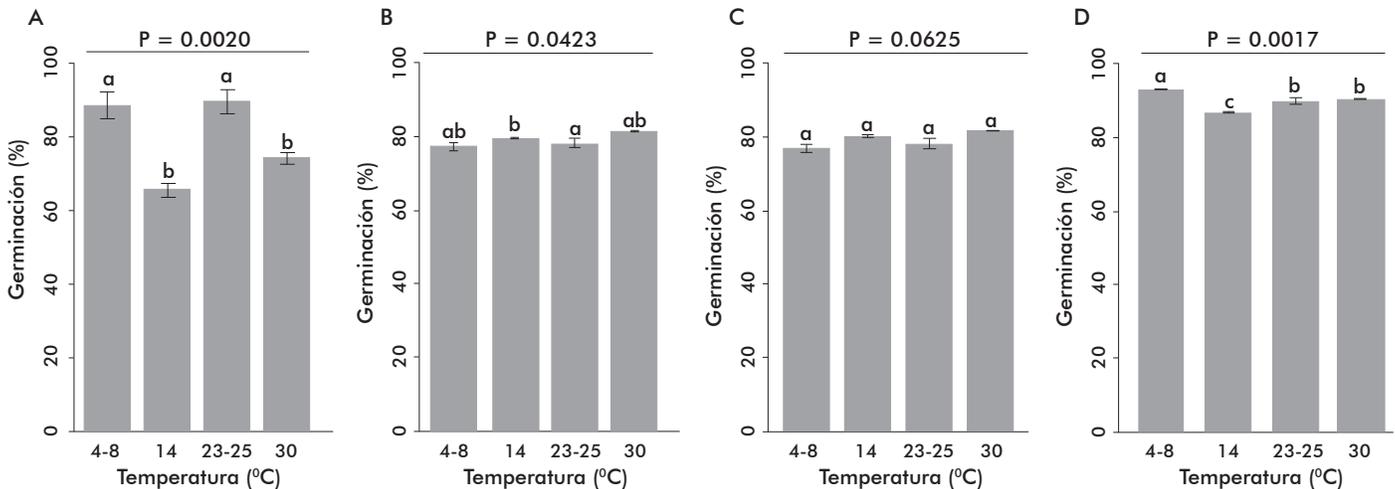


Figura 1. Análisis de los porcentajes de germinación del formulado líquido de *Purpureocillium* sp. (Cepa UdeA 0109), sometido a diferentes temperaturas, durante cuatro tiempos: A) día 8; B) día 15; C) día 30; D) día 90. Letras distintas muestran diferencias entre los tratamientos ( $p \leq 0.05$ ).

Es importante añadir que la formulación se presentó como una suspensión homogénea, sin crecimientos miceliales en la superficie, durante el tiempo de estudio, lo cual se observó en los controles. Al igual que en este ensayo, varios autores han descrito que existen procesos de formulación que no afectan las esporas y que, por el contrario, mejoran la estabilidad y vida útil en almacenamiento de estas estructuras [3, 10-13].

En todos los tratamientos y condiciones, la pureza osciló en el rango 99-100 %, que de acuerdo con las normas de control de calidad de hongos entomopatógenos, debe ser superior al 90 % [3, 10], lo que denota la adecuada calidad de la formulación por parte de la casa comercial (Laverlam).

De acuerdo con estos resultados, la formulación comercial líquida no mostró ningún efecto adverso sobre la germinación ni la pureza de las estructuras de la cepa UdeA 0109 en los tiempos y temperaturas evaluados.

#### Prueba de patogenicidad in vitro

Con relación a la concentración letal media ( $CL_{50}$ ) posterior a los 5 días, los análisis mostraron que la concentración de  $10^4$  conidias/mL puede afectar el 50 % de la población. A partir de esos resultados, se decidió evaluar las concentraciones por debajo y por encima de esa, en invernadero. Esta  $CL_{50}$  supera a bioformulaciones comerciales nematocidas de *P. lilacinum* y *Pochonia chlamydospora* usadas *in vitro*, en que las concentraciones de  $1.03 \times 10^8$  esporas/mL logran un efecto nematocida sobre estadios de *Radopholus similis* [14], lo cual muestra la posibilidad de que este producto pudiera ser usado en concentraciones menores en campo, aspecto que debe ser evaluado. Mediante la alteración morfológica de los huevos, se evaluó el efecto de las dosis. En la concentración de  $10^2$  conidias/mL se evidenció el 10 % de los huevos afectados, mientras que en la concentración  $10^8$ , el 99 % de los huevos estaba morfológicamente alterado (Figuras 2 y 3). Finalmente, la formulación mostró la propiedad de afectar los huevos después de dos meses de almacenamiento a temperatura ambiente, aun cuando se continuó la evaluación cualitativa y mostraba viabilidad luego

del séptimo mes (datos no mostrados), aspecto también deseable en una formulación.

#### Evaluación en condiciones de invernadero

##### Determinación de la permanencia del hongo en el suelo

En el tiempo cero, correspondiente al momento de la inoculación, se evidenció una disminución de la concentración de las conidias en las tres concentraciones evaluadas, con respecto a la concentración que se había aplicado inicialmente. Al observar el comportamiento de las concentraciones del hongo durante el experimento, al quinto día se observó un aumento de las u.f.c. Entre tanto, en los días 10 y 15, la cantidad de u.f.c. permaneció relativamente constante durante el estudio. A los 20 días se observó una disminución de las u.f.c., lo que indicó que el momento ideal para una nueva aplicación era entre los 10 y 15 días. De acuerdo a estos resultados, se estableció la aplicación del bioformulado cada 15 días, pues de esta manera se podría mantener constante la densidad de esporas del hongo en el suelo, lograr un control efectivo de

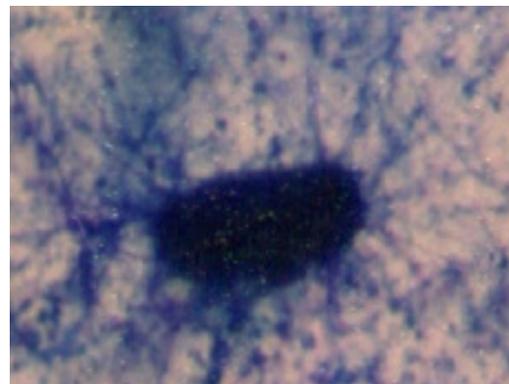


Figura 2. Aspecto de un huevo de *Meloidogyne* spp. morfológicamente alterado. Los contenidos se han reemplazado por el crecimiento micelial. Observación al microscopio óptico (40x).

10. Bastidas A, Velásquez SE, Marín P, Benavides P, Bustillo AE, Orozco FJ. Evaluación de preformulados de *Beauveria bassiana* (balsamo) Vuillemin, para el control de la broca del café. *Agron.* 2009;17(1):44-61.

11. Hong TD, Edgington S, Ellis RH, de Muro MA, Moore D. Saturated salt solutions for humidity control and the survival of dry powder and oil formulations of *Beauveria bassiana* conidia. *J Invertebr Pathol.* 2005;89(2):136-43.

12. Gato CY. Métodos de conservación y formulación de *Trichoderma harzianum* rifai. *Fitosanidad.* 2010;14(3):189-95.

13. Urtuvia UH, France A. Formulaciones de hongos entomopatógenos para control de plagas. *Inia Tierra Adentro.* 2007;(nov-dic.):46-9.

14. Alzate D, Guzmán OA, Leguizamón Caycedo J. Efecto *in vitro* de *Purpureocillium lilacinum* (Thom) Luangsa, Ard et al. y *Pochonia chlamydospora* (Goddard) Zare y Gams sobre el nematodo barrenador *Radopholus similis* (Cobb) Thorne. *Agron.* 2012;20(2):25-36.

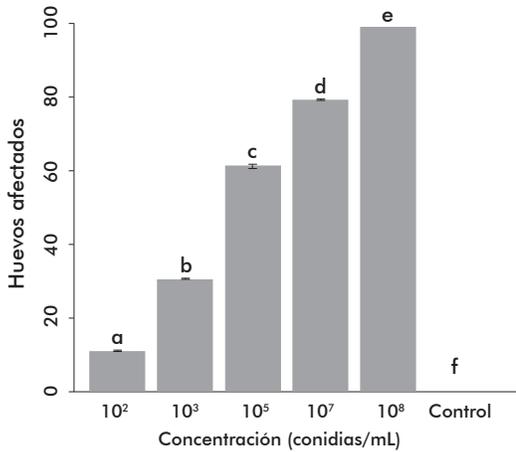


Figura 3. Evaluación de las concentraciones del formulado del hongo *Purpureocillium* sp. (Cepa UdeA 0109) sobre el porcentaje de los huevos de *Meloidogyne* spp. afectados, comparados con su control. Letras distintas muestran diferencias entre los tratamientos, y de estos con el control ( $p \leq 0.05$ ).

*Meloidogyne* spp. a largo plazo y disminuir la cantidad de bioformulado usado. En estudios de otros autores [15], las u.f.c. de *P. lilacinum* eran más bajas que las adicionadas al inicio del experimento. La disminución de u.f.c. entre dos y tres semanas después de la aplicación inicial, la han reportado otros investigadores [16, 17].

**Establecimiento de las poblaciones de segundos estadios juveniles**

En el tratamiento con tres aplicaciones del bioformulado, la disminución de los nematodos en estadio J2 en 100 g de suelo mostró diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre las concentraciones 10<sup>5</sup>, 10<sup>7</sup> y 10<sup>8</sup> conidias/mL con respecto al control y los demás tratamientos (Figura 3A). Los tratamientos que alcanzaron mayor cantidad de individuos J2 correspondieron a 10<sup>2</sup> y 10<sup>3</sup> conidias/mL, con 79 y 57 nematodos, respectivamente; mientras que la concentración con menor número fue 10<sup>8</sup> con 14 nematodos en estadio J2/100 g de suelo (Figura 4A).

Se afectó más del 90 % de los huevos en todas las concentraciones evaluadas, lo que mostró que todos los tratamientos tuvieron diferencias significativas con respecto al control ( $p \leq 0.05$ ) (Figura 4D).

Tras cinco aplicaciones del bioformulado, no se observaron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) en la disminución de la población J2 entre el control y las concentraciones 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>7</sup> conidias/mL, y las poblaciones J2 de *Meloidogyne* spp. oscilaron entre 164 y 329 nematodos/100 g de suelo. Solo se observaron 14 nematodos con la concentración de 10<sup>8</sup> conidias/mL (Figura 4B). Con respecto a los huevos, todas las concentraciones presentaron diferencias significativas con respecto al control ( $p \leq 0.05$ ), con afectaciones entre el 50 y el 90 %. A pesar de que entre las concentraciones 10<sup>7</sup> y 10<sup>8</sup> conidias/mL no hubo diferencias significativas, en la concentración 10<sup>8</sup> se evidenció el mayor número de huevos afectados (Figura 4E). Para este número de aplicaciones hubo un incremento de las poblaciones

15. Anastasiadis IA, Giannakou IO, Prophetou-Athanasidou DA, Gowen SR. The combined effect of the application of a biocontrol agent *Paecilomyces lilacinus*, with various practices for the control of root-knot nematodes. *Crop Protect.* 2008;27:352-61.

16. Kiewnick S, Mendoza A, Sikora RA. Efficacy of *Paecilomyces lilacinus* strain 251 for biological control of the burrowing nematode *Radopholus similis* [Abstract]. *J Nematol.* 2004;36:326-7.

17. Kiewnick S, Sikora RA. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* strain 251. *Biol Control.* 2006;38(2):179-87.

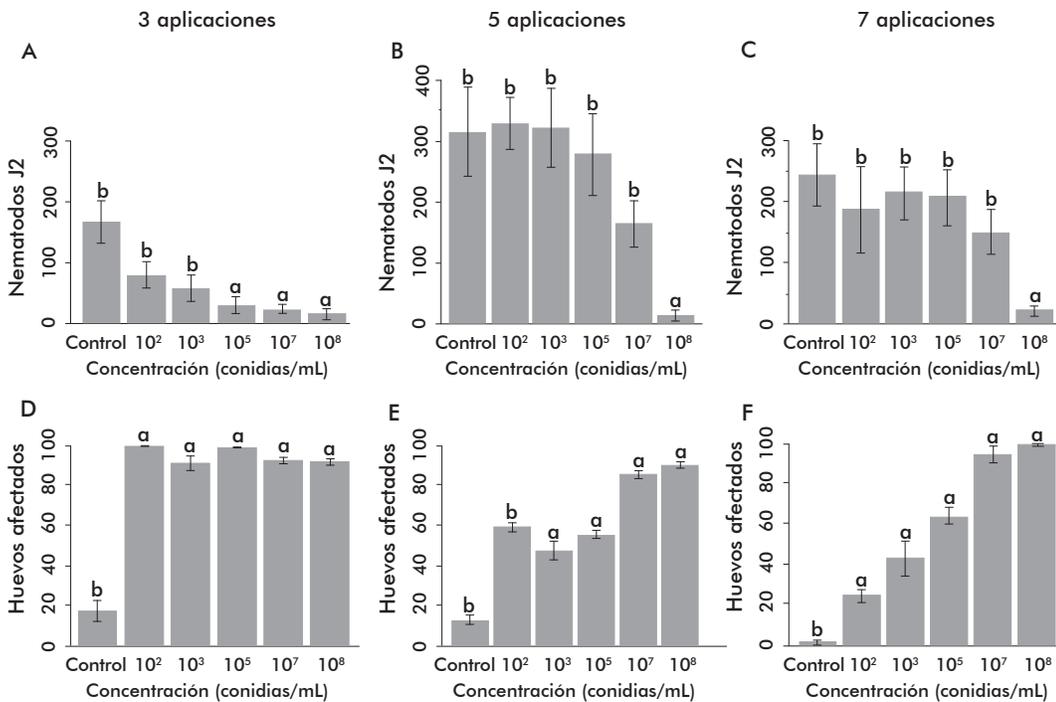


Figura 4. Efecto de la aplicación de una formulación del hongo *Purpureocillium* sp. (Cepa UdeA0109) a diferentes concentraciones en plantas de tomate, sobre dos estadios de *Meloidogyne incognita-javanica*. Se hicieron tres pruebas, en 42 plantas cada una, con 3, 5 y 7 aplicaciones, respectivamente, seguidos de evaluaciones a los 35, 75 y 105 días, por ese orden. A-C) Afectación a los nematodos en estadio juvenil 2 (J2) en las diferentes concentraciones de la formulación, comparados con su control. D-E) Afectación a los huevos de nematodos en diferentes concentraciones del formulado, comparados con su control. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).

de nematodos J2 en las concentraciones más bajas ( $10^2$ ,  $10^3$ ), así como en el control. Este resultado pudo deberse a que a pesar de ser la segunda evaluación, aquellas poblaciones que lograron ingresar en la raíz desde el inicio del experimento, culminaron su ciclo reproductivo. Ello se comprobó por la presencia de nodulaciones en el material evaluado. En otros estudios de nuestro grupo, se ha observado cómo la cepa UdeA 0109 no se comporta como endófito y solo ataca las poblaciones de nematodos expuestas. En este sentido, se ha reportado que el tomate es altamente susceptible a *Meloidogyne* spp. y, de acuerdo con la variedad, la formación de agallas en la raíz puede ser mayor, con un incremento en la producción de huevos, algunos de ellos alojados en el interior de los tejidos, lo cual disminuye las probabilidades de infección por el hongo [18]. Debido a ello, es necesaria la determinación del efecto preventivo del producto, aspecto que tendrá que ser estudiado en el campo, ya que algunos autores han reportado que es preciso la aplicación pretrasplante de otras cepas de *P. lilacinum* para disminuir el inóculo de nematodos en suelo, su reproducción y el daño a las raíces [16, 19]. Otro aspecto por el que pudo haber incremento poblacional de los nematodos J2, es la forma en que la formulación se inoculó en el suelo. De acuerdo con la metodología en esta investigación, la primera aplicación se hizo mediante una mezcla directa del hongo con el suelo, mientras que las demás aplicaciones se efectuaron agregando la cepa alrededor del tallo de la plántula, en forma superficial, sin mezclarla con el suelo. Otros autores hallaron que el sistema radical y la profundidad de la inoculación del hongo en el suelo, pueden ser importantes en la propiedad del hongo para controlar las poblaciones de *Meloidogyne* sp. [15], lo cual se debe evaluar con más detenimiento en investigaciones ulteriores.

En el tratamiento de siete aplicaciones del bioformulado, se observó diferencias significativas entre el control y la concentración  $10^8$  conidias/mL para nematodos J2 ( $p \leq 0.05$ ) (Figura 4C). Se observaron 21 individuos/100 g de suelo, mientras que las concentraciones de  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^5$  y  $10^7$  conidias/mL no mostraron diferencias con el control. En los huevos (Figura 4F) se encontraron diferencias significativas

en todas las concentraciones con respecto al control ( $p \leq 0.05$ ). Las concentraciones con más huevos afectados fueron  $10^7$  y  $10^8$  conidias/mL, con 100 % de afectación. Al igual que en las pruebas anteriores, la concentración de  $10^8$  se consideró mejor, debido a que mantuvo bajos niveles de nematodos en estadio J2. Es importante señalar que algunas cepas de hongos pueden variar y necesitar concentraciones mayores a  $1 \times 10^7$  esporas/mL para ser infectivas, lo cual se ha descrito [20]. La necesidad de mantener una concentración de *P. lilacinum* en suelo de  $10^6$  o mayor, también se ha referido [19, 21] y confirmado en el presente estudio, en que las mejores concentraciones fueron  $10^7$  y  $10^8$ .

## Conclusiones

Se comprobó la calidad microbiológica de la formulación líquida de la cepa UdeA 0109 y su patogenicidad sobre estados del complejo *Meloidogyne incognita-javanica*. En investigaciones posteriores sería oportuno evaluar si la concentración de  $10^7$  conidias/mL, registrada como eficaz en el presente estudio, ejerce un mejor control, comparado con otros productos biológicos nematicidas disponibles en el mercado, cuyas concentraciones efectivas oscilan entre  $10^8$  y  $10^{12}$  [22]. Adicionalmente, es importante resaltar que, de acuerdo con los resultados, se tiene información sobre la frecuencia de aplicación del bioformulado para la disminución de las poblaciones de huevos y nematodos en estadio juvenil J2 en condiciones de invernadero, lo cual es útil para la validación de estos resultados en campo.

## Agradecimientos

Se agradece a los integrantes del grupo BIOMA por sus aportes en el desarrollo de la investigación. El trabajo que dio origen a esta publicación fue financiado por el Comité para el Desarrollo de la Investigación (CODI) de la Universidad de Antioquia (Medellín, Colombia) y la empresa Laverlam S.A. (Cali, Colombia), bajo el Código E01568.

18. López-Llorca LV, Jansson HB. Biodiversidad del suelo: control biológico de nematodos fitopatógenos por hongos nematofagos. Cuadernos de Biodiversidad. 2001;(6):12-5.

19. Stirling GR. Biological control of plant parasitic nematodes: soil ecosystem management in sustainable agriculture. 2ed. Wallingford: CABI; 2014.

20. Sahebani N, Hadavi N. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. Soil Biol Biochem. 2008;40(8):2016-20.

21. Mendoza AR, Sikora RA, Kiewnick S. Influencia de la dosis y el tiempo de aplicación de *Paecilomyces lilacinus* cepa 251 sobre el control biológico del nematodo barrenador *Radopholus similis* en banano. Nematropica. 2007;37(2):203-13.

22. Corporación Colombiana de Investigación agropecuaria CORPOICA. Listado de empresas de bioinsumos registradas. 2013 [cited 2013 Oct 2]. Available from: <http://www.ica.gov.co/Areas/Agricola/Servicios/Fertilizantes-y-Bio-insumos-Agricolas/Listado-de-Bioinsumos/2009/EMPRESAS-REGISTRADAS-BIOINSUMOS-JULIO-8-DE-2008.aspx>.

Recibido en noviembre de 2013.

Aprobado en octubre de 2014.