

CENTRO NACIONAL DE SANIDAD AGROPECUARIA
Dirección de Protección de Plantas. Grupo Plagas Agrícolas

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS AGRICOLAS
Departamento de Biofertilizantes y Nutrición de las Plantas



**INTERACCIÓN DE *Glomus mosseae* - *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* Y
Meloidogyne incognita EN TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.).**

**Tesis presentada en opción al Título Académico de Maestro en Ciencias en
Nutrición de las Plantas y Biofertilizantes.**

Autor: Ing. Miguel Angel Hernández Socorro.

**Tutores: Dr C. Mayra G. Rodríguez Hernández.
Dr C. Martha A. Álvarez Gil.**

**La Habana
2009**

RESUMEN

El uso combinado de Controles Biológicos, Micorrizas y la resistencia genética constituyen alternativas ecológicas para el manejo de poblaciones de nematodos formadores de agallas (*Meloidogyne* spp.), una de las principales plagas del cultivo del tomate. En este estudio se evaluó, en macetas (microplot), la interacción de los hongos micorrizógenos arbusculares (*Glomus mosseae*) y el hongo nematófago (*Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* cepa IMI SD 187), en el manejo de *Meloidogyne incognita* raza 2 en tomate (*Solanum lycopersicum* L. variedad Eliana, portadora del gen *Mi*, Álvarez y col., 2004). El experimento se desarrolló durante el periodo del 18 de diciembre/ 2006 al 12 de marzo/ 2007. Se establecieron 5 tratamientos (aplicaciones simples y combinadas de ambos hongos) y un control, con 10 repeticiones en un diseño experimental completamente aleatorio. Las variables evaluadas fueron: Masa fresca de la raíz (g), Índice de Agallamiento, Número de ootecas.g de raíz⁻¹, Número de huevos.ootecas⁻¹, UFC.g de raíz⁻¹, UFC.g de sustrato⁻¹, porcentaje de colonización de ootecas y de parasitismo de huevos, masa seca de la raíz, masa seca de la biomasa aérea y rendimiento (kg.planta⁻¹). Los resultados demostraron la capacidad de ambos microorganismos para establecerse en el sustrato y las raíces de las plantas. Se constató que, la colonización de masas de huevos de *M. incognita* por *P. chlamydosporia* fue de 70% cuando este hongo actuaba sólo y que su actividad disminuyó a 60% en el tratamiento donde se combinó con *G. mosseae*, así como que la actividad parasítica de huevos disminuyó de un 30% a 25% en el tratamiento donde se aplicó *P. chlamydosporia* + *G. mosseae*. Por su parte, el número de huevos.ootecas⁻¹, fue menor en los tratamientos donde *P. chlamydosporia* actuó sólo con respecto al tratamiento simple con *M. incognita*. Sin embargo, el Índice de Agallamiento disminuyó y los rendimientos aumentaron en las plantas tratadas con micorrizas y el hongo nematófago. Los resultados de esta tesis sugieren que ambos organismos pueden ser empleados juntos en el manejo de *M. incognita* en el tomate (*S. lycopersicum*, variedad Eliana).

Palabras Clave: *Glomus mosseae*; *Pochonia chlamydosporia*; *Meloidogyne incognita*; *Solanum lycopersicum* y Controles biológicos.

Dedicatoria

*A la memoria de mi papá Angel María Hernández Espinosa y a la de
nuestra compañera de trabajo Lourdes Sánchez Portales*

A mi mamá Blanca Miriam Socorro Hernández

A mis dos hijos Miguelito y David

Agradecimientos

- Al Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas y al Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria por haber contribuido en mi formación como profesional desde que forme parte de sus colectivos de trabajadores en 1981 y 1995 respectivamente.
- A todo el colectivo de profesores de la maestría de Nutrición de las plantas y Biofertilizantes, que desde el primer momento me aceptaron y nunca repararon en brindarme su ayuda en los momentos que los moleste (Nicolás, Pedro José, Adriano, Corbera, Yakelín, Lorelí, Ramón Rivera, Alberto Hernández, Gloria, Fernando, Juan Miguel Calaña, Blanca M. de la Noval, Inés, Walfredo) y al Dr C. Víctor M Paneque, aunque físicamente ya no se encuentre, siempre estará presente entre nosotros.
- A mis tutoras: Mayra G. Rodríguez Hernández y Martha A. Álvarez Gil que desde el primer momento se brindaron y aceptaron este reto, por su dedicación y enriquecerme con sus conocimientos tan amplios, por la valiosa revisión del documento y darme la oportunidad de trabajar con ellas.
- A Ileana Miranda, por su excelente colaboración en el procesamiento estadístico de los resultados.
- A Lucy, por su valiosa e incondicional colaboración y ayuda.
- A mi amigo Angel Leyva Galán, por su valiosa ayuda y consejos.
- A Leopoldo Hidalgo y Rodolfo Plana, por los asesoramientos y revisión del documento.
- A todos mis compañeros de estudio en la maestría.
- A todo el colectivo de trabajadores del departamento de nutrición de las plantas y Biofertilizantes (Aida, Tomás, Julio Calvo, Hilda Bompío, Valkiria, Julio César, Domingo, David, Juan de Dios, Alfredo Calderón, Mayda Calderón, Luis Roberto, Lianne, Yonaisy Mujica, Yosnel, Bannie, Pablo).
- Al todo el colectivo de trabajadores de la dirección de Protección de Plantas (Belkis Peteira, Benedicto, Esteban, Aurelia) y Al colectivo de trabajadores del grupo Plagas agrícolas (Juan, Héctor, Moraima, Maria de los A., Reinaldo, Margarita Ceballos, Aida,).
- Al colectivo de trabajadores del laboratorio de nematología y de la planta piloto (Roberto, Lili, Luis, Zoila del Valle (lamentablemente ya no se encuentra entre nosotros), (Jersy, Nerdys, Yeysey, Nivian, Idalina), pilares importantes en el trabajo evaluaciones.
- A nuestros estudiantes (Wilson, Yanetsy, Blanca, Yadira)
- A los técnicos de campo (Eduardo Cruz, Noel Zaldivar, Alexy Andrial, Osmel Ortíz y Julia Rosabal).
- A (Regla Mercedes Lara, Carlos Moya, Zoilo Terán, Maria Elena Dominí, Elsa González, Alina Porto, Mario Rentaría, Justo Orihuela, Miguel Pérez, Julio Kesell, Wilfredo Michael Rey (Willy), Orestes Cruz, Marisela, que también contribuyeron).
- A la Dr C. Lourdes Sánchez Portales, quien fue mi compañera de trabajo y amiga.

- A mis padres que siempre fueron los primeros en influir en mi formación.
- A mis dos hijos Miguelito y Daviel.
- **A mí esposa** Dulce M. García Benítez, que es parte de este trabajo, sin ella y colaboración, en impregnarme amor, dedicación y soportarme, no hubiera sido posible este empeño.
- A la revolución cubana por darnos la oportunidad de estudiar en un país libre y a quien debemos atribuir con nuestros conocimientos para el desarrollo de la ciencia.
- **A TODOS DE CORAZÓN MUCHAS GRACIAS**

ÍNDICE	Páginas
1. INTRODUCCIÓN	1 - 2
2. CAPÍTULO I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3 - 24
2.1. El cultivo del tomate. Generalidades.	3
2.2. Los nematodos fitoparásitos. Características generales.	5
2.2.1. <i>Meloidogyne</i> spp.: Plaga de las hortalizas. Características generales y aspectos de su bioecología.	6
2.2.2. <i>Meloidogyne</i> spp.: Elementos de las principales tácticas utilizadas para su Manejo.	10
2.3. <i>Pochonia chlamydosporia</i> . Distribución. Clasificación taxonómica y característica.	13
2.3.1. Proceso de infección <i>P. chlamydosporia</i> sobre huevos de <i>Meloidogyne</i> spp. y proliferación.	15
2.3.2. Interacciones entre <i>Meloidogyne</i> spp - <i>P. chlamydosporia</i> - Planta hospedante.	16
2.3.3. Integración de <i>Pochonia chlamydosporia</i> como agente de control biológico con otras tácticas para el manejo de nematodos formadores de agallas.	18
2.4. Los Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA). Concepto, clasificación y distribución. Funciones en los agroecosistemas.	19
2.4.1. Desarrollo de la simbiosis micorrízica arbuscular (MA).	20
2.4.2. Beneficios de la simbiosis micorrízica arbuscular (MA):	21
2.4.3. Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y su papel en la "protección" de las plantas.	22
3. CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS	25 - 41
Ubicación del experimento, características edafoclimática del área y descripción de la unidad experimental (microplot).	25
Actividades previas al establecimiento del experimento: Trabajo con el sustrato y producción de agentes biológicos.	29
Producción de plántulas e introducción del HMA. Tratamiento del sustrato con el ACB.	33
Inoculación de nematodos, seguimiento y evaluación del experimento.	35
3.1. Estudio de la interacción <i>S. lycopersicum</i> var. Eliana - <i>G. mosseae</i> - <i>P. chlamydosporia</i> var. <i>catenulata</i> , y su impacto en el desarrollo de <i>M. incognita</i> .	36
3.1.1. Desarrollo de <i>M. incognita</i> raza 2 en tomate, var. Eliana.	38
3.1.2. Evaluación de la colonización del sustrato y raíces de las plantas por <i>P. chlamydosporia</i> var. <i>catenulata</i> y capacidad parasítica sobre <i>M. incognita</i> raza 2 en las raíces <i>S. lycopersicum</i> , var. Eliana, colonizadas previamente con HMA.	38
3.1.3. Interacción de <i>G. mosseae</i> y <i>P. chlamydosporia</i> sobre la reproducción de <i>M. incognita</i> en tomate var. Eliana.	40
3.2. Comportamiento de la variedad de tomate Eliana en presencia de <i>G. mosseae</i> , <i>P. chlamydosporia</i> y <i>M. incognita</i> .	40
3.3. Análisis Estadístico.	41
4. CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42 - 61
4.3. Discusión General	59
5. CONCLUSIONES	62
6. RECOMENDACIONES	63

1. INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.), es una de las hortalizas más importantes, debido al lugar que ocupa en los hábitos alimenticios de una amplia parte de la población mundial (Casanova y col., 1991; Nuez, 1995; Álvarez y col., 1997; Gómez y col., 2000). Su cultivo representa más del 30% de la producción hortícola mundial, con una superficie de siembra de casi tres millones de hectáreas y producciones de 78 millones de toneladas.año⁻¹(Gómez y col., 2000).

En Cuba, el tomate ocupa el 42% del área destinada a hortalizas, con un nivel de producción de 800 000 t. año⁻¹ y rendimiento promedio de 13.4 t.ha⁻¹, valores que ubican a nuestro país en el sexto lugar, con relación a superficie sembrada y en el lugar 29 por sus rendimientos (Hernández y Chailloux, 2004; FAOSTAT, 2006). Entre los factores que limitan la producción del tomate en Cuba se han referido la falta de variedades con adaptación a las condiciones climáticas, susceptibilidad a plagas de las variedades comerciales y prácticas inadecuadas de manejo, entre otros (Gómez y col., 2000).

Dentro del grupo de organismos que constituyen plagas para el cultivo a escala mundial se encuentran los nematodos formadores de agallas (*Meloidogyne* spp.), los que provocan pérdidas en los rendimientos de los cultivos alimenticios y de la producción protegida de hortalizas (Casanova y col., 2003; Rodríguez, 2003 a y b; Cuadra y col., 2005; Rodríguez y col., 2006), aunque las pérdidas no han sido cuantificadas.

Tradicionalmente, se han utilizado diferentes alternativas para reducir las poblaciones de nematodos, destacándose durante décadas la aplicación de productos químicos, muchos de los cuales han tenido impacto negativo sobre la salud humana y el ambiente (Labrada y Fornasari, 2001; Braga y col., 2003). De ahí que, las tendencias actuales en el manejo de *Meloidogyne* spp. están basadas en el empleo del Manejo Integrado de Nematodos (MIN) (Rodríguez y col., 2007). En los programas MIN, entre otras tácticas, se involucran microorganismos de suelo (Azcón 2001), en los que se agrupan los agentes de control biológico (ACB) y hongos micorrízicos arbusculares (HMA), los que han tenido un amplio desarrollo en Cuba (Rivera y col., 2003; Hidalgo y Kerry, 2008), mostrando resultados favorables en el manejo de nematodos (Puertas, 2007). De igual modo, el uso de la resistencia varietal (genotipos con gen *Mi*) constituye una alternativa especialmente valiosa dentro del MIN (Rodríguez y col., 2005), contando en la actualidad con una variedad (Eliana, desarrollada por el INCA) contentiva del gen *Mi*, que deberá ser valorada agronómicamente y en condiciones de

producción (Álvarez y col., 2006), ya que a temperaturas superiores a los 28 °C, la protección completa que confiere dicho gen se inactiva por lo que deberá combinarse con otros elementos del MIN para su explotación agrícola.

El uso combinado de alternativas como la resistencia genética, Biofertilizantes y agentes de control biológico deberán ser estudiadas en las condiciones de Cuba, a fin de ofrecer elementos que validen o no su inclusión en programas de MIN.

Problema científico

La nueva variedad de tomate Eliana, desarrollada por el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, ha sido señalada como genotipo con potencialidades para el manejo de *Meloidogyne*, de modo que se impone la necesidad de su evaluación junto a organismos nativos, como son, *Glomus* spp. y *P. chlamydosporia*, para obtener información sobre su comportamiento bajo condiciones de campo, de producirse poblaciones significativas del nematodo en dicha variedad.

Sobre la base de estos antecedentes se formuló la siguiente **hipótesis** de trabajo:

El uso conjunto de *Glomus mosseae* y *Pochonia chlamydosporia* var *catenulata*, cepa IMI SD 187, en *Solanum lycopersicum* L. var. Eliana, afecta el desarrollo de *Meloidogyne incognita*, por tanto ambos microorganismos contribuirán al mejor desarrollo del genotipo y al manejo de poblaciones de este nematodo en condiciones de producción.

Para darle respuesta a esta hipótesis se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo general

- Determinar el efecto de *G. mosseae* y *P. chlamydosporia* var. *catenulata* cepa IMI SD 187, sobre *Meloidogyne incognita* en tomate, variedad Eliana, con la finalidad de obtener información para su uso en el manejo integrado de dicho nematodo.

Objetivos específicos

1. Evaluar el comportamiento de la variedad Eliana frente a *M. incognita* en condiciones semicontroladas.
2. Determinar si la presencia de HMA en las raíces y rizosfera de tomate, variedad Eliana, limitan la colonización y efectividad de *P. chlamydosporia* var *catenulata* sobre *M. incognita* raza 2.
3. Evaluar el comportamiento vegetativo y productivo de la variedad de tomate Eliana en presencia de *M. incognita*, *G. mosseae* y *P. chlamydosporia*.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. El cultivo del tomate. Generalidades.

El tomate pertenece a la Clase: dicotiledóneas, Orden: Solanales, Familia: Solanaceae, Tribu: Solaneae, Género: *Solanum*, Especie: *Solanum lycopersicum* L., sección *Lycopersicon* (Peralta y col., 2005). Originario de zonas montañosas de los Andes (*S. lycopersicum*) e Islas Galápagos (*Solanum cheesmaniae* Riley y *Solanum galapagense* Darwin & Peralta) en América del Sur. Ha podido ser cultivado en una amplia diversidad de ambientes a escala mundial, en los cuales se pueden encontrar especies silvestres de elevada variabilidad y que son reservorio de genes con características diversas (Nuez, 1995; Darwin y col., 2003).

Se plantea que, al parecer, la domesticación del tomate partió de cultivares primitivos de *S. lycopersicum* (ex *Lycopersicon esculentum* Mill.), variedad *cerasiforme* desde México y Centroamérica (Peralta y col., 2006) y que su expansión se produjo en el siglo XVI, acompañada de infundios acerca de su toxicidad, sin embargo, la capacidad de esta planta de adaptarse a diversos climas y condiciones edáficas, junto a sus cualidades gustativas, hicieron que hoy se cultiven diversas variedades (Causse y col., 2000).

El tomate cultivado es una planta muy ramificada, cuyo sistema radical puede extenderse en un diámetro de 0.50 m alrededor del tallo principal y alcanzar 1.5 m de profundidad, aunque generalmente el 70 % de las raíces se localizan en los primeros 20 cm del suelo (Rodríguez y Álvarez, 1995). Su tallo es anguloso, recubierto de pelos y su desarrollo puede ser determinado o indeterminado (Gómez y col., 2000).

La floración se produce en forma de racimos simples o compuestos. En los cultivares de crecimiento determinado, el primer racimo aparece normalmente después de la quinta hoja, mientras que, en los cultivares indeterminados, suele aparecer el primer racimo después de la séptima hoja y, los siguientes, cada tres hojas (Lawrence, 2003). Las flores son hermafroditas con cinco o más sépalos verdes que siguen creciendo una vez cuajado el fruto, y cinco o más pétalos de color amarillo intenso, las cuales pueden variar desde claro a más oscuro (Plana, 1996).

El fruto del tomate es una baya globosa o periforme, de color generalmente rojo en la maduración, aunque algunos cultivares presentan otras coloraciones, por lo que presentan diferentes formas y tamaño. Los de uso industrial alcanzan una masa promedio entre 50 y 120 g, mientras que los de consumo fresco superan los 120 g (Agrobit, 2003).

Con relación a las condiciones edafoclimáticas propias para este cultivo, se sabe que en las condiciones del trópico, éstas se encuentran cerca del límite biológico de tolerancia para la especie (Gómez y Depestre, 1992 citados por Casanova y col., 2003) y por ello, la productividad del cultivo en la zona es baja. Se ha señalado que diversos factores limitan la producción en las condiciones tropicales, entre estos, el someter a las plantas a estrés hídrico, altas temperaturas, días cortos, suelos con altos contenidos de partículas muy finas (arcillas), que tienen tendencia a compactarse durante el cultivo, dificultando la penetración del agua de riego y provocando asfixia radical, entre otros (Rodríguez, 1995).

El manejo agrotécnico de las plantaciones, tiene entre sus objetivos paliar la influencia negativa que pueden ejercer los factores edafoclimáticos adversos, de ahí que una buena preparación del suelo deberá propiciar la infiltración del agua y una buena aireación, lo que redundará en un desarrollo radical adecuado en extensión y profundidad. Por su parte, la densidad de plantación, dependerá del desarrollo vegetativo del cultivar elegido y su hábito de crecimiento, así como del tipo y fertilidad del suelo y el riego, entre otros factores.

Con relación a la necesidad de nutrientes minerales, este cultivo está considerado como de alta demanda, debido principalmente, al gran volumen de frutos producidos por unidad de superficie, señalando Menezes Dos Santos (1992) que la cantidad de nutrientes encontrada en los frutos cosechados es relativamente superior en comparación con otras hortalizas, especialmente, de potasio. De ahí que, en Cuba, Maestrey (1986) señalara que las cantidades de fertilizantes químicos a aplicar dependía del tipo de suelo, pero que se encontraba en el orden de 120-200 kg de N, 140- 160 kg de P_2O_5 y de 100 - 225 kg de K_2O .ha⁻¹.

En la actualidad, se han implementado en el país nuevas tecnologías para la producción de tomate, debido a las desfavorables condiciones edafoclimáticas para su cultivo, que combinan las características de adaptación de nuevos genotipos (desarrollados por la ciencia cubana o adquiridos a firmas prestigiosas) con la mejora de las condiciones de producción, así por ejemplo, se han introducido cultivos en hidropónicos, organopónicos y la producción protegida donde, junto a una mejor nutrición y riego, se hacen uso de nuevas tecnologías para el manejo de las plagas.

Con relación a estos organismos se sabe que, en la actualidad, los nematodos formadores de agallas constituyen una de las plagas que limitan la producción de tomate en todas las instalaciones de producción protegida del país (Rodríguez y col., 2006, Muiño, 2008) y aparecen también en las áreas de producción del sistema de

agricultura urbana (Cuadra y col., 2005), de ahí que buscar alternativas para su manejo representa un imperativo para investigadores y productores vinculados a estas producciones.

2.2. Los nematodos fitoparásitos. Características generales.

Los representantes del Phylum Nematoda (Nemata) han existido por billones de años, haciendo de éste uno de los grupos de animales más antiguos y diversos que pueblan la tierra (Wang y col., 1999). Se encuentran distribuidos en todos los ambientes donde haya posibilidad de vida, o sea, que exista al menos, una pequeña película de agua, ubicándose entre los representantes más abundantes de la fauna del suelo, planteando Wyss (1997) que los nematodos se han establecido por ellos mismos en casi todos los nichos ecológicos posibles, lo que han logrado a pesar de la relativa simple estructura de sus cuerpos y organización uniforme. Unos 25 géneros son parásitos de plantas superiores, mientras otros afectan a los animales (incluyendo los insectos) y el hombre. Otro grupo importante es el que representa a los nematodos de vida libre, los que son comunes en la rizosfera y juegan un rol importante en la descomposición y liberación de nutrientes en el suelo (Hunt y col., 2005).

Estos nematodos poseen algunas características comunes. Son organismos no segmentados, poseen simetría bilateral, son triploblásticos y pseudocelomados. Tienen una cutícula exterior que es secretada desde la hipodermis. Los músculos se unen longitudinalmente a la hipodermis, permitiéndoles moverse dorso-ventralmente. Poseen sistema digestivo, reproductivo, excretor, nervioso y muscular. Carecen de sistema circulatorio y respiratorio, dependiendo de las paredes de su cuerpo para la difusión del agua, gases y metabolitos. Casi todas las especies poseen sexos separados y, por lo general, los machos son más pequeños que las hembras, presentándose dimorfismo sexual en algunos géneros (Decraemer y Hunt, 2006).

Los nematodos fitoparásitos o parásitos de plantas se distinguen del resto por poseer una estructura parecida a una aguja hipodérmica llamada estilete, la que utilizan para perforar las células, introducir en la planta proteínas y metabolitos que le facilitan el proceso de parasitismo y tomar sus alimentos. Estos nematodos poseen además un sofisticado sistema nervioso y órganos sensoriales que les permiten encontrar la planta hospedante, localizar células específicas, aparearse y reproducirse (Lambert y Bekal, 2002; Decraemer y Hunt, 2006).

Todos los fitonematodos son parásitos biotróficos obligados que requieren de los nutrientes de células vivas, las que son modificadas por ellos por secreciones salivares emitidos por ellos al inicio de la ingestión de los alimentos (Wyss, 1997).

De acuerdo a sus hábitos de alimentación los fitonematodos se agrupan en: Ectoparásitos migratorios, los que durante todo el ciclo de vida se mantienen fuera de la raíz y se alimentan de células de la epidermis o células poco profundas en la raíz. Ectoparásitos sedentarios, se mantienen fuera de la raíz durante todo el ciclo de vida y se alimentan de células modificadas en un mismo sitio por largos períodos. Por su parte, los Endoparásitos migratorios penetran al sistema radical y se alimentan de las células a medida que se mueven o migran a través de las raíces, mientras que los Endoparásitos sedentarios, penetran al sistema radical y se alimentan de células modificadas, pierden la capacidad de moverse y mantienen su sitio activo de alimentación durante todo el ciclo. En los Endoparásitos de bulbos y tallos, el juvenil de cuarto estado penetra los tejidos de estos órganos y una vez en el interior, se alimenta como un endoparásito migratorio; Los Endoparásitos de hojas, desarrollan su ciclo de vida en el interior de las hojas penetrando a través de los estomas y una vez en el interior, migran y se alimentan. Mientras que los Endoparásitos de semillas, primeramente se alimentan de las hojas y cuando las plantas florecen, penetran el primordio floral y se alimentan de la semilla en desarrollo, mudan y continúan alimentándose hasta que destruyen las semillas (Hussey y Williamson, 1998; Nicol, 2002; Barker, 2003; Hunt y col., 2005).

Según Whitehead (1998), los nematodos fitoparásitos causan pérdidas de alrededor del 10% de la producción agrícola mundial. Entre los que más afectan, los nematodos del género *Meloidogyne* son considerados de suma importancia económica a nivel mundial (Trudgill, 1997; Trudgill y Blok, 2001).

2.2.1. *Meloidogyne* spp.: Plaga de las hortalizas. Características generales y aspectos de su bioecología.

Según Netscher y Sikora, 1990 citados por Ornat y Sorribas (2008) este género de nematodos llega a provocar pérdidas en vegetales del 30% en condiciones de campo. Señalaron además que *Meloidogyne* parasita a los vegetales en campo abierto y en las instalaciones de producción protegida y que la importancia económica de este género depende de la frecuencia de infestación y los niveles poblacionales. Los daños son grandes en los vegetales en las casas de cultivos, debido a la susceptibilidad de las variedades empleadas, la intensidad del cultivo y los factores ambientales (Rodríguez y col., 2005; 2006; Ornat y Sorribas, 2008).

En Cuba, donde los estudios de pérdida son escasos, se sabe que *Meloidogyne* spp. provocó pérdidas de 19% en pimiento (*Capsicum annuum*, L.) (Castillo, 1988), 20% en tomate y quimbombó (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench) y 17% en berenjena (*Solanum melongena* L.) (Stefanova y Fernández, 1995). En casos de altas poblaciones, se han informado pérdidas en pepino (*Cucumis sativus* L.) relacionadas con *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood, de más del 70% (Gómez, 2007), de ahí la importancia de implementar medidas para el manejo de estos nematodos en las áreas de producción de hortalizas.

El género *Meloidogyne*, ubicado en el grupo de los endoparásitos sedentarios, ha evolucionado hacia una relación de alimentación con sus hospedantes muy compleja y especializada (Hussey y Williamson, 1998), de ahí que este grupo de nematodos biotróficos viven en estrecha relación con el hospedante a través de las células de las que se alimentan “sin matarlas” (Dalmasso y col., 1992 citados por Gómez, 2007).

La posición sistemática de los nematodos formadores de agallas hasta el nivel de Familia ha sido objeto de discusión durante muchos años y luego de los estudios de De Ley y Blaxter (2002), su ubicación taxonómica se expresa como sigue:

Phylum *Nematoda* Pott, 1932; **Clase** *Chromadorea* Inglis, 1983; **Subclase** *Chromadoria* Pearse, 1942; **Orden** *Rhabditida* Chitwood, 1933; **Suborden** *Tylenchina* Thorne, 1949; **Infraorden** *Tylenchomorpha* De Ley y Blaxter, 2002; **Superfamilia** *Tylenchoidea* Örley, 1980; **Familia** *Meloidogynidae* Skarbilovich, 1959; **Subfamilia** *Meloidogyninae*, Skarbilovich, 1959; **Género** *Meloidogyne* Göldi, 1892.

Este género posee más de ochenta especies (Subbotin y Moens, 2006), de las cuales diez son importantes plagas. Destacándose *M. incognita*, *Meloidogyne javanica* (Treib) Chitwood, *Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood, *Meloidogyne hapla* (Chitwood), y la recientemente considerada plaga emergente, *Meloidogyne mayaguensis* Rammah y Hirshmann (Eisenback y Triantaphyllou, 1991; Walters y Barker, 1994; Rodríguez y col., 2007b).

En Cuba, se ha informado la presencia de *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica*, *M. hapla*, *M. mayaguensis*, y *M. grahami* Golden y Slana (Sánchez y col., 1994; Rodríguez y col., 1995; Fernández y col., 1998; Rodríguez, 2000). Sin embargo, la especie de mayor distribución es *M. incognita* (Fernández y col., 1998; Gómez, 2007), la que afecta un gran número de plantas (Cuadra y Bernal, 1997; Fernández y Ortega, 1998; Fernández y col., 1998; 2001; Cuadra y col., 2002; Gandarilla, 2005; Gómez, 2007), entre las que se encuentra el tomate.

La morfología de los nematodos formadores de agallas cambia durante su ciclo de vida y se caracteriza por presentar un marcado dimorfismo sexual (Hunt y col., 2005), donde las hembras adultas son globosas y los machos vermiformes (Karssen y Moens, 2006).

Los huevos de *Meloidogyne* spp. están retenidos dentro de una matriz gelatinosa secretada por la hembra (Wright y Perry, 2006), denominada ooteca, la que se encuentra expuesta hacia el exterior de la raíz, cuando las agallas son pequeñas (al inicio de las infestaciones), y en el interior de éstas, en raíces altamente agalladas, aspecto que debe tenerse en cuenta cuando se seleccionan medidas biológicas para el manejo de las poblaciones (Hidalgo 2000). Con relación a la cantidad de huevos producidos por cada hembra se plantea que el valor oscila desde 500 a 1500 huevos (Ornat y Sorribas, 2008).

Los juveniles de segundo estado (J2) son los especímenes infestivos, aparecen frecuentemente libres en el suelo, pero también se encuentran dentro de las raíces, buscando nuevos sitios de alimentación. Una vez que los J2 abandonan el huevo, si se encuentran en el interior de las raíces, infestan los tejidos cercanos y, si por el contrario, se encuentran en el exterior, migran en el suelo en busca del hospedante. Este estadio del ciclo, en su penetración y movimiento utilizan medios mecánicos y químicos, señalándose que, segregan enzimas digestivas que debilitan la lámina media entre células (Fenoll y del Campo, 1998).

En las raíces, cuando los J2 alcanzan el cilindro vascular en desarrollo, reconocen una célula particular y se establecen, convirtiéndose dicha célula en la precursora del sitio de alimentación. En la inducción de estos sitios, están involucrados complejos mecanismos que son “iniciados” en presencia de las secreciones de los nematodos. La formación de la célula gigante, como sitio de alimentación permanente, es el resultado de repetidas divisiones nucleares sin citokinesis, donde después de 24h de la penetración del estilete del nematodo se pueden observar dos núcleos y en las próximas 24h más de 10, lo que resulta en una célula grande multinucleada (Abad y col., 2003).

Al formarse estas células gigantes, se bloquean los vasos del xilema e inducen la multiplicación de células corticales, que aumentan en tamaño y número, produciéndose la agalla o nódulo en la raíz (Almeida-Engler y col., 1999). El tamaño de la agalla está relacionado con la planta hospedante, el número de J2 que penetren y la especie de nematodo (Karssen y Moens, 2006; Gómez, 2007).

Una vez fijados en el sitio de alimentación, las larvas pasan por una segunda, tercera y cuarta muda, hasta alcanzar su fase adulta y madurez sexual. Durante la última muda, las larvas que se convierten en machos cambian dramáticamente su forma y abandonan la raíz, pues no se alimentan. Por su parte, las hembras comienzan a engrosar su cuerpo y, como consecuencia, provocan ruptura de los tejidos de la planta quedando conectadas a través de su estilete al sitio de alimentación. Las hembras se reproducen sexual o asexualmente (Hunt y col., 2005; Karssen y Moens, 2006).

Dentro de los huevos se forma el primer estado larval y se produce la primera muda antes de eclosionar como J2 (Hunt y col., 2005; Karssen y Moens, 2006). La producción de huevos es un proceso muy perjudicial para la planta infestada, pues su formación supone una gran demanda de agua, nutrientes y productos de la fotosíntesis por parte de las hembras de *Meloidogyne* spp. (Fenoll y del Campo, 1998).

Diversos factores influyen sobre el ciclo de vida de estos nematodos, conociéndose que los niveles poblacionales y la duración del ciclo dependen de su adaptación al ambiente físico (textura, humedad, aireación y temperatura) y biológico del suelo, su compatibilidad con la planta hospedante y el consiguiente acceso a fuentes de nutrientes (van Gundy, 1985).

La temperatura se considera el factor de mayor influencia en la duración del ciclo de vida de *Meloidogyne* spp., estableciéndose que en ambientes tropicales el ciclo de vida es más corto y viceversa. Así, tenemos que cuando el proceso transcurre entre 28 y 30°C, se completa en unos 21 días (Sánchez y Rodríguez, 1998). Otros factores que influyen sobre *Meloidogyne* spp., son la porosidad, oxigenación, porcentaje de arena, arcilla y el pH, demostrándose que las poblaciones de estos nematodos se desarrollan mejor en los suelos arenosos que en los suelos arcillosos (Edongali y Ferris, 1982).

Por su parte, los nematodos son activos en suelos con niveles de humedad del 40-60% de la capacidad de campo. En suelos secos ocurre una drástica reducción del número de huevos y juveniles y en condiciones de excesiva humedad se reduce la eclosión de los huevos, así como el metabolismo, movimiento e infestividad de los J2 y el crecimiento y reproducción de las hembras (van Gundy, 1985), por lo que este factor es determinante también en la biología de estos nematodos.

Debido a su alto potencial reproductivo, ciclos de vida cortos, capacidad de parasitar unas 2000 especies de plantas y los daños que provoca, *Meloidogyne* spp., es considerado plaga en la producción de alimentos, así por ejemplo, hoy se sabe que constituye una importantísima plaga en las plantaciones en campo abierto y el factor limitante de la producción protegida de tomate en Cuba (Rodríguez y col., 2006;

Gómez, 2007; Muiño, 2008), de ahí la importancia de establecer medidas de manejo para disminuir el impacto de estos parásitos sobre los rendimientos y calidad de las cosechas, debido a sus daños directos (Fernández y col., 1998; Fernández y Ortega, 1998; Karssen y Moens, 2006) y a su capacidad de intervenir en enfermedades de etiología compleja junto a hongos (*Phytophthora* spp.; *Phytium* spp., *Fusarium* spp.) y bacterias (*Ralstonia solanacearum* Smith) (Suarez y col., 1992; Ateka y col., 2001; Castillo y col., 2003).

2.2.2. *Meloidogyne* spp.: Elementos de las principales tácticas utilizadas para su Manejo.

La aplicación de productos químicos a los suelos y su relación con el aumento de la productividad de los cultivos fue, precisamente, uno de los elementos que hicieron que los investigadores y productores confirieran importancia a este vasto grupo de organismos habitantes del suelo, de ahí que, el control químico fue el método utilizado con mayor frecuencia a partir de la segunda mitad del siglo XX. Este método es indudablemente eficaz para el control de diferentes especies de nematodos fitoparásitos, resultando uno de los productos más populares el Bromuro de Metilo. Sin embargo, su empleo ha sido restringido y en muchos países prohibido, por los efectos nocivos al ambiente y la salud humana y por el deterioro que provoca a la capa de Ozono (Thomas, 1993).

El impacto negativo que los nematicidas han provocado al hombre y su entorno (Brown y ferry, 1987) ha hecho que en los últimos años, investigadores, productores y decisores trabajen en la búsqueda de alternativas de manejo para los nematodos dirigidas a la sustitución de los productos químicos por prácticas mas amigables con el agroecosistema. Entre las principales tácticas que hoy se emplean se destacan las que representan medidas físicas, culturales, el uso de agentes biológicos, el control bioquímico y genético, entre otras (Rodríguez y col., 2005; 2006; Rodríguez y col., 2007; Vázquez y Fernández, 2007).

El denominado Control Físico, consiste en la utilización de algún agente físico como la temperatura, humedad, radiación solar, en rangos que resulten letales para los nematodos. El fundamento del método es que estos organismos sólo pueden desarrollarse y sobrevivir dentro de ciertos límites de intensidad de los factores físicos ambientales; pues más allá de límites mínimos y máximos, las condiciones resultan letales (Brown y Ferry, 1987; Noling, 1999). Enmarcadas en este tipo de control se cuentan el uso de Vapor, Solarización y la Inundación, con resultados variables en el manejo de nematodos, pero que, de manera general, bien aplicados resultan efectivos

(Van Gundy, 1985; Alcázar, 1991; Lamberti, 1997; Noling, 1999; Rodríguez-Kábana, 1997; McSorley y McGovern, 2000; Bello, 2001; Tayeta, 2001; Fernández y col., 2004; Urbano; 2004).

Otro tipo de control muy utilizado desde inicios de la propia agricultura es el llamado Control cultural o manejo cultural, ya que la mayoría de las prácticas o labores de cultivo tienen un impacto directo o indirecto sobre la incidencia y severidad de las enfermedades ocasionadas por organismos del suelo (Widmer y col., 2002). Entre las principales prácticas culturales para el manejo de nematodos se encuentran el barbecho, la rotación de cultivos, uso de cultivos trampa, cultivos de cobertura, enmiendas orgánicas, biofumigación y el uso de cultivares resistentes e injertos (Ruelo, 1983; Castillo, 1988; D'Addabbo, 1995; Stefanova y Fernández, 1995; Bello y col., 1997; Miguel, 1997; Rodríguez-Kábana, 1997; Trivedi, 1998; Williamson, 1998; Noling, 1999; Cuadra y col., 2000; Díaz-Viruliche, 2000; Ploeg, 2002; Wang y col., 2002; Braga y col., 2003; Cuadra y col., 2005; Díaz-Viruliche y col., 2004; Gómez y Rodríguez, 2005; Matthiessen y Kirkegaard, 2006; Rodríguez y col., 2006; Gómez, 2007, Ornat y Sorribas, 2008, Ploeg, 2008).

Por su parte, el Control Biológico, tan viejo como la propia agricultura (Bilgrami, 2008), es en la actualidad una excelente herramienta en el manejo de los nematodos, si se utilizan estos organismos benéficos dentro de programas de manejo integrado y no se dejan solos en el enfrentamiento con las poblaciones de nematodos (Rodríguez y col., 2006), señalando Hidalgo - Díaz y Kerry (2008) que ningún organismo u agente de control biológico (ACB) proveen adecuado control cuando son aplicados solos.

Según Bilgrami (2008), el control biológico puede ser definido como la acción de parásitos, predadores y patógenos en el mantenimiento de las densidades poblacionales de otros organismos, a niveles más bajos que las que presentan dichos organismos en ausencia de estos biorreguladores.

Para el manejo de nematodos fitoparásitos, entre los grupos microbianos con mayores potencialidades se encuentran las bacterias y los hongos (Stirling, 1991; Kerry y Jaffee, 1997).

Dentro de las bacterias, la especie *Pasteuria penetrans* (Thorne) Sayre y Starr, parásito obligado de nematodos formadores de agallas y otros géneros de nematodos, ha sido muy estudiada y utilizada (Ciancio y col., 1999; Gowen y col., 2008). La mayoría de los aislamientos son altamente infectivos, sus endosporas son resistentes a la desecación y pueden sobrevivir en el suelo. Su población se incrementa con el cultivo repetido de plantas hospedantes susceptibles a los nematodos, señalando

Kerry (1997) que al ser un parásito obligado, su reproducción masiva *in vitro* y su proliferación en el suelo en ausencia de nematodos es difícil. No obstante, se sabe actualmente que la reproducción *in vitro* ha sido posible por Pausteria BioScience LLC de Florida con el uso de fermentadores (Gowen y col., 2008) lo que sin dudas aumentará su aplicación agrícola.

De igual modo, se conocen especies del género *Bacillus* que han sido señaladas como organismos potenciales para el manejo de nematodos. Sus toxinas afectan la morfología de los huevos y/o juveniles de nematodos, y algunos aislamientos tiene la capacidad de colonizar y destruir huevos de *Meloidogyne* spp. (Gullino y Benuzzi, 2003).

En Cuba, se ha demostrado la actividad biológica de las cepas LBT-24 y LBT-25 de *Bacillus thuringiensis* Berliner contra *M. incognita* (Márquez y col., 2003; 2004), pero presentan limitantes en su uso, debido a su poca persistencia en el campo y el hecho de no llegar a abarcar todos los nichos ecológicos (Fernández-Larrea, 2002).

Por su parte, otra bacteria constituye el ingrediente activo del producto HeberNem®, el que es producido y comercializado por los laboratorios HeberBiotech (Cuba). Posee en la actualidad amplio uso en el manejo de *Meloidogyne* spp., en casas de cultivo protegidos y la especie de bacteria que contiene es *Tsukamurella paurometabola* (Steinhaus) cepa C924, demostrando ser efectiva también en el manejo de *Radopholus similis* (Cobb) Thorne y *Pratylenchus* spp., estando su modo de acción centrado en la liberación de sulfuro de hidrógeno y quitinasas (Mena y col., 2004; 2005). Este producto posee una limitante, su efectividad se expresa en suelos con un contenido de materia orgánica superior al 3%, condición que no siempre se encuentra en los suelos de forma natural.

Otro grupo de bacterias, denominadas rizobacterias promotoras del crecimiento, colonizan las raíces y se convierten en “envolturas biológicas” que retrasan la invasión por los nematodos (Rodríguez-Kábana, 1997), producen toxinas o alteran los exudados de las raíces, haciéndolas menos atractivas a los fitonematodos y su antagonismo ha sido asociado con la producción de quitinasas y colagenasas (Oostendorp y Sikora, 1990 citados por Puerta, 2006). Entre estas bacterias se refieren especies de *Rhizobium* Frank, *Bradyrhizobium* Jordan, *Azotobacter chroococcum* Beijerinck y *Azospirillum brasilense* Tarrand, Krieg y Döbereiner (Hallman y col., 2001; Mahdy y col., 2001; Reimann y Sikora, 2001; Siddiqui y Mahmood, 2001; Siddiqui y col., 2001; Siddiqui y col., 2002 todos citados por Puerta, 2006).

Con relación a los hongos, Ornat y Sorribas (2008) señalaron que numerosos antagonistas de nematodos han sido encontrados en la zona mediterránea, entre ellos: *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare y Gams var. *chlamydosporia*, *P. chlamydosporia* var. *catenulata*, *Fusarium oxysporum* f.sp., *F. solani*, *Fusarium* spp., *Acremonium strictum* (W. Gams), *Gliocladium roseum* (Bainier), *Cylindrocarpon* spp., *Engyodontium album* (Limber) y *Dactylella oviparasitica* (Strain). A escala mundial, Stirling (1991) y Kerry (2000) informaron a especies de *Hirsutella*, *Arthrobotrys*, *Dactylarya*, *Fusarium*, *Paecilomyces* y *Pochonia*.

En Cuba, se aplicó con éxito *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson, pero su uso fue suspendido entre los años 1993 y 1995 debido a informes internacionales de los hallazgos de infecciones de cepas de este hongo en pacientes inmuno-deprimidos.

Otro grupo que recibió atención a inicios de los años 2000, fue el género *Arthrobotrys* (Gómez y col., 2003), pero su desarrollo como producto comercial nunca se materializó. Por su parte, especies del género *Trichoderma* han sido utilizadas para el manejo de nematodos en Cuba, debido a su versatilidad, adaptabilidad y fácil manipulación (Fernández-Larrea, 2001) y, sobre todo, a su disponibilidad, al ser el hongo de mayor producción en los CREE, lo que ha posibilitado que *Trichoderma* spp. se emplee con éxito, junto a otras tácticas en el manejo de nematodos, en cultivos hortícolas en sistemas de Agricultura Urbana y Cultivos Protegidos (Méndez y Polanco, 2000; Fernández y col., 2004; Pérez y col., 2004a y b; Rodríguez y col., 2005; 2006).

En Cuba, la cepa seleccionada IMI SD 187 de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* ha reducido significativamente las infestaciones de nematodos en sistemas de producción comercial de vegetales en combinación con el uso de plantas pobres hospedantes (Atkins y col., 2003; Hidalgo-Díaz y Kerry, 2004 citados por Hidalgo-Díaz y Kerry, 2008).

2.3. *Pochonia chlamydosporia*. Distribución. Clasificación taxonómica y característica.

El hongo nematófago *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare y Gams (ex *Verticillium chlamydosporium* Goddard), es un parásito facultativo de huevos de nematodos formadores de quistes y agallas, presentes comúnmente de forma natural como saprofito en una gran diversidad de suelos y agro-ecosistemas de todo el mundo (Gams y Zare, 2001). Entre las especies más estudiadas por sus potencialidades como ACB se señala *P. chlamydosporia*, con sus variedades *chlamydosporia* y *catenulata*.

En estudios realizados por Hidalgo (2000 y 2002), en suelos de dos regiones montañosas de Cuba, obtuvieron 83 aislamientos de hongos nematofagos del género *Verticillium* (ex- *Verticillium chlamydosporium* Goddard), encontrando una gran variabilidad intraespecífica en este género, notificando la presencia de tres especies y dos variedades, así como las características de los aislamientos cubanos coincidieron con las descripciones de los aislamientos que procedían de países europeos realizadas por Gams (1988).

Gams y Zare (2001) después de desarrollar una revisión del género *Verticillium*, informaron la siguiente posición sistemática: **Reino:** Fungi; **Phylum:** Deuteromycota; **Clase:** Hyphomycetes; **Género:** *Pochonia*; **Especie:** *Pochonia chlamydosporia*. Sinónimos: *Verticillium chlamydosporium*; *Stemphyliosis ovorum* Petch; *Diheterospora heterospora* (Kamyschko, 1962), *Pochonia humicola* (Batista y Fonseca, 1965), *Dictyoarthrinopsis kelleyi* (Dominik y Majchrowicz, 1966), *Diheterospora chlamydosporia* (Barron y Onions, 1966).

Para este género y las especies incluidas, Gams y Zare (2001), informaron las siguientes características: Colonias de rápido crecimiento, con 15-40 mm de diámetro de la colonia a los diez días en extracto de malta. Conidióforos usualmente postrados y pequeñas hifas diferenciadas, algunas veces erectas, fiálides verticiladas o solitarias, y conidios de forma subglobosa, elipsoidal a bacilar. Producen dictioclamidosporas sobre la superficie de la colonia o sumergidas en el agar. Cristales ausentes.

Goddard (1913), señaló como característica más distintiva de la especie *chlamydosporia* la formación de clamidosporas, las cuales son más abundantes en el micelio viejo, que adquiere una coloración crema a ocrácea, mientras que el estado verticilado ocurre más abundantemente sobre micelio joven cerca del margen de la colonia.

La descripción dada por Gams (1988) señala que las colonias sobre agar-malta son de color blanco a crema, u ocráceo pálido dada la presencia de clamidosporas, con micelio usualmente fino y fiálides emergiendo simples o en racimos de dos a tres, a partir de hifas postradas. También se presentan en racimos terminales de cuatro o cinco. Los conidios son subglobosos a ovoides o elipsoidales, midiendo 3 - 4,5 x 1,5 - 2,2 μm . Las clamidosporas, de 20 – 25 μm de diámetro, se producen abundantemente sobre un pedúnculo en el micelio aéreo. Para el caso de la variedad *catenulata*, las colonias son similares, mientras que los conidios son subglobosos a dacroides, midiendo 2 - 3,5 x 1,7 - 2,5 μm , con su base, y en ocasiones el extremo, ligeramente puntiagudo, dispuestos en cadenas.

La distinción entre conidios dispuestos en fiálides en cadenas y en falsas cabezas permitió definir las variedades *catenulata* y *chlamydosporia*, respectivamente, dentro de la especie *V. chlamydosporium* (Gams, 1988). Este criterio lo mantuvieron Gams y Zare (2001) al reubicar esta especie en el género *Pochonia*.

Peteira B (2005) realizó la caracterización de *P. chlamydosporium* var. *Catenulata*, cepa IMI SD 187, demostrando que esta posee clamidosporas que contienen alto contenido de proteínas, que pueden tener enzimas que sirven para la degradación de los diferentes sustratos y que le posibilitan una mejor sobrevivencia.

2.3.1. Proceso de infección *P. chlamydosporia* sobre huevos de *Meloidogyne* spp. y proliferación.

En observaciones realizadas por Morgan-Jones y col. (1983) y Seger y col. (1996), sobre el proceso de infección de los huevos de *Meloidogyne* spp., demostraron que *P. chlamydosporia* forma una red de micelio en estrecho contacto con las masas gelatinosas (ootecas), produciéndose la penetración de los huevos a través de apresorios desarrollados al final de largas hifas o ramas laterales, donde se desarrollan tubos de penetración extremadamente finos y cortos, los que, inmediatamente después que penetran la cutícula de los huevos, se ensanchan.

López-Llorca y col. (2002a y b) observaron que *P. chlamydosporia* parasita huevos de nematodos formadores de agallas y quistes, formando apresorios que se adhieren a la cubierta del huevo. La forma y número de apresorios y la extensión de su crecimiento sobre la superficie del huevo están determinados por el nematodo hospedante (Segers y col., 1996). Posteriormente, se produce la penetración de la cubierta del huevo y la digestión del contenido del mismo (Jansson y López-Llorca, 2004).

La penetración de la cutícula de los huevos de *Meloidogyne* spp. por *P. chlamydosporia* es producto de la acción conjunta de la presión física y una actividad enzimática de tipo hidrolítica específica, correspondiente a enzimas como esterases, proteasas de tipo serina, quitinasas y lipasas; que juegan un papel importante en la degradación de cada una de las láminas que conforman la estructura y composición química de la capa externa de los huevos (Segers, 1996; Morton y col., 2003b; Tikhonov y col., 2002; Mendoza de Gives y col., 2003; Huang y col., 2004; Morton y col., 2004; Peteira, 2006). Adicionalmente, López-Llorca (2008) informó que *P. chlamydosporia* tiene la acción de producir metabolitos que frenan la acción de la eclosión de los huevos de nematodos.

Todos los estados de *P. chlamydosporia* ocurren en el suelo (Baker, 1974). Las clamidosporas le permiten al hongo sobrevivir cuando el hospedante es escaso (Leij y

Kerry, 1991), hasta tres meses (Kerry y col., 1993), mientras que la dispersión en el suelo producto del crecimiento de las hifas es muy limitada (Kerry, 1988b). No obstante, el hongo puede colonizar la rizosfera y proliferar en el suelo (Bourne y col., 1996), siendo más abundante en los orgánicos que en suelos minerales (Kerry, 1989), con temperatura de 22 °C (óptima para la esporulación *in vitro*), mientras que, después de una generación, la colonización de la rizosfera es mejor a temperaturas de 20 °C, 25 °C y 30 °C (Leij y col., 1992).

2.3.2. Interacciones entre *Meloidogyne spp* - *P. chlamydosporia* - Planta hospedante.

Como *P. chlamydosporia* es un parásito facultativo, tiene una fase saprofitica que es afectada por la planta hospedante, debido a las complejas interacciones que tienen lugar en la rizosfera (Kerry, 2001). Se ha comprobado que *P. chlamydosporia* es capaz de formar una cadena de hifas en las células epidérmicas y corticales, sin llegar al cilindro vascular de las raíces de la planta hospedante (López-Llorca y col., 2002a).

Las especies de plantas presentan diferencias en cuanto a su capacidad para permitir el crecimiento de *P. chlamydosporia* y se ha comprobado que en especies de plantas pobres hospedantes del hongo, la densidad del mismo no aumenta significativamente, aún cuando las tasas de aplicación sean incrementadas grandemente (Bourne y Kerry, 1999). Un crecimiento amplio de *P. chlamydosporia* en la rizosfera es esencial para el control de los nematodos (de Leij y Kerry, 1991), por tanto, las especies de plantas deben ser cuidadosamente seleccionadas si se desea obtener el máximo de efectividad del ACB (Puertas, 2006).

Aunque el papel de los exudados radicales sobre el crecimiento del hongo y su cambio de estado saprofitico a parasítico no se conoce, se ha demostrado que un exceso de carbono inhibe la producción de enzimas clave involucradas en el proceso de infección (Segers y col., 1999). La estimulación del crecimiento fúngico en raíces infestadas ocurre cuando aparecen las ootecas, lo cual puede ser resultado directo de la colonización de estas o de la liberación de nutrientes por la rizosfera (Bourne y col., 1996).

Por otro lado, la efectividad de este hongo como ACB se ve afectada por la susceptibilidad a los nematodos de la planta hospedante y por el número de nematodos que invaden las raíces, ya que grandes densidades de nematodos en un cultivo susceptible dan lugar a que una cantidad significativa de ootecas permanezcan dentro de las agallas, alejadas de la acción de *P. chlamydosporia*. Por el contrario, la efectividad de *P. chlamydosporia* como ACB se ve favorecida en cultivos pobres

hospedantes de *Meloidogyne* spp., que permitan un crecimiento abundante del hongo y una mejor colonización de las masa de huevos, lo que proporciona una gran reducción en la población de nematodos formadores de agallas (Bourne y col., 1996; Kerry y Bourne, 1996).

Aunque los aislamientos de *P. chlamydosporia* difieren en su virulencia, especies distintas de nematodos formadores de agallas son igualmente susceptibles a un aislamiento específico del hongo. Los huevos inmaduros son más fácilmente infectados que los huevos que contienen juveniles de segundo estado, y muchos pueden escapar de la infección a temperaturas de 30°C, ya que estos maduran y eclosionan antes que las ootecas sean totalmente colonizadas por el hongo (Kerry, 2001).

Por tanto, la eficacia de *P. chlamydosporia* se ve afectada por factores claves como: la cantidad de hongo en la rizosfera, la velocidad de desarrollo de los huevos en las masas y el tamaño de las agallas en las cuales se desarrollan las hembras.

En Cuba, se aislaron y probaron diferentes especies de *Pochonia* para el control de *M. incognita*. De los aislamientos estudiados se seleccionó la cepa IMI SD 187, de la variedad *catenulata*, como la más promisoría, con un 68% de huevos de *M. incognita* parasitados en condiciones semicontroladas y el 70% de las masas de huevos colonizadas en la rizosfera del tomate, después de seis meses de aplicado el hongo en una sucesión de cultivos (Hidalgo-Díaz, 2000; Hidalgo-Díaz y col., 2000; Atkins y col., 2002; Atkins y col., 2003).

Para esta cepa, se desarrolló una tecnología de Fermentación en Estado Sólido en Bolsa que permite obtener mayores rendimientos en la producción de clamidosporas, con el uso de un sistema de gestión de la calidad bajo la Norma Cubana NC ISO 9001 (Montes de Oca, 2005a). Además, se demostró que el método de subcultivos no afecta el comportamiento de indicadores culturales, morfológicos, enzimáticos, productivos y patogénicos, ni la producción de enzimas asociadas con la infección de los huevos de *M. incognita*, lo cual reafirma la robustez de la cepa (Montes de Oca y col., 2005b; Peteira B y col., 2005a).

Su efectividad como ACB de nematodos formadores de agallas ha sido comprobada en experimentos en macetas y en pequeñas parcelas (Kerry e Hidalgo-Díaz., 2004; Montes de Oca y col., 2005b; Puertas, 2006; Puertas y col., 2007).

Los resultados obtenidos acerca del potencial de *P. chlamydosporia* y en particular, de la cepa IMI SD187 de la variedad *catenulata*, como agente de control biológico de nematodos formadores de agallas señalan que, además de incrementar la eficiencia

en la producción del ACB, se requiere estudiar y mejorar las técnicas de aplicación, como soporte al uso práctico de este hongo. Se hacen necesarias evaluaciones más extensivas a nivel de campo que permitan profundizar en los conocimientos de la dinámica de la interacción hongo-nematodo y los factores que la afectan. Así como deben ser desarrollados otros estudios dirigidos a evaluar el efecto del agente de control biológico sobre microorganismos beneficiosos, tales como otros antagonistas, hongos micorrízicos arbusculares, bacterias fijadoras de nitrógeno y organismos nativos del suelo en general (Puertas, 2006).

2.3.3. Integración de *Pochonia chlamydosporia* como agente de control biológico con otras tácticas para el manejo de nematodos formadores de agallas.

Aplicaciones conjuntas de *P. chlamydosporia* con otros agentes (*P. penetrans*, *Paecilomyces lilacinus*, *Hirsutella rhossiliensis*, *Gigaspora margarita*, *Glomus deserticola*) ha brindado resultados satisfactorios, demostrado por el aumento del parasitismo de huevos y reducción de poblaciones de nematodos formadores de agallas (Leij y col., 1992; Siddiqui y Mahmood, 1995; Rao y col., 1997, 1998; Viaene y Abawi, 2000; Cannayane y Rajendran, 2001).

Su aplicación, junto a otras prácticas como abonos verdes, enmiendas orgánicas y rotación de cultivos, ha sido efectiva, incrementando la actividad del hongo (Davies y col., 1991; Campos y Campos, 1996; Ehteshamul y col., 1996a y b).

Otros investigadores como Bourne, (2001) y Verdejo-Lucas y col., (2003), realizaron aplicaciones en tratamientos combinados del hongo *P. chlamydosporia* con nematicidas, como aldicarb y oxamyl, demostrando compatibilidad y efectividad en el control de nematodos formadores de agallas.

La efectividad de dos tipos de inóculo de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* dentro de una secuencia de cultivos tomate-habichuela-tomate-col, para ser utilizada como estrategia de rotación de cultivo en el manejo de poblaciones de *M. incognita*, fue evaluada por Puertas (2006), donde el hongo se estableció y proliferó perfectamente en el sustrato y raíces de los cultivos durante todo el desarrollo del experimento, encontrándose sus poblaciones en un rango de 5 a 6 x 10⁴ UFC en el sustrato y 4 a 6 x 10³ UFC en las raíces.

Puertas (2006), realizó experimentos a nivel de macetas donde evaluó la interacción de *P. chlamydosporia*, cepa IMI SD 187, con otros microorganismos beneficiosos de interés agrícola como *Rhizobium* Frank, *Trichoderma harzianum* Rifai y *Glomus clarum* Nicol, en el manejo de *M. incognita*, demostrando la efectividad y actividad parasítica

de *P. chlamydosporia* como ACB en la reducción de las poblaciones de nematodos formadores de agallas y su compatibilidad con los microorganismos estudiados.

2.4. Los Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA). Concepto, clasificación y distribución. Funciones en los agroecosistemas.

El término micorriza, describe una asociación mutualística entre hongos del suelo y plantas superiores, y etimológicamente significa hongo de la raíz, derivado del griego mico (hongo) y riza (raíz); y fue utilizado por primera vez por Albert Bernard Frank en el año 1928. Trappe, 1994, citado por Jonson y col., (1997) define a las micorrizas en términos funcionales y estructurales como “órganos de absorción dobles que se forman cuando los hongos simbiotes viven dentro de los órganos de absorción sanos (raíces, rizomas o tallos) de plantas terrestres, acuáticas o epifitas”.

Se plantea que existen tres tipos de micorrizas, las cuales se diferencian, principalmente, por su morfología, siendo estas: (i) las ectomicorrizas, que poseen unas 5000 especies, pertenecientes a Basidiomicetes, crecen intercelularmente en la corteza de la raíz de las plantas, formando un manto fungoso observable a simple vista (ii) Las ectoendomicorrizas, son ectomicorrizas que presentan penetración intracelular y (iii) las endomicorrizas, que no afectan la morfología externa de la raíz, por lo que no es posible observarlas a simple vista, crecen inter e intra celularmente y forman, dentro de las células corticales, estructuras específicas fungosas; son las más importantes y las más ampliamente distribuidas, tanto geográficamente, como en las plantas superiores. Este último tipo, también llamadas Micorrizas Arbusculares, se presentan en la mayoría de las especies de plantas y se estima que, aproximadamente, el 96% de las plantas forman dicho tipo de asociación (Read, 1999).

Los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA), se han clasificado taxónomicamente a partir de la similitud de caracteres morfológicos, funciones fisiológicas y criterios filogenéticos (Schenk y Pérez, 1997; Morton, 1988; 1990a y b). Están clasificados en la **clase** Zygomycotina, **orden** Glomales y agrupados entre las **familias**: Glomaceae, Acaulosporaceae y Gigasporaceae. Los **géneros** más comunes son: *Acaulospora*, *Entrophospora*, *Gigaspora*, *Glomus*, *Sclerocystis* y *Scutellospora* (Morton, 2000).

La morfología de los HMA es simple, poseen esporas de origen asexual, heterocarióticas, multinucleados, con micelio aseptado, característico de los Zygomycetos y se les considera biótrofos obligados, dada su necesidad de un hospedero para desarrollarse (Sieverding y Toro, 1988; Smith y Gianinazzi-Pearson, 1988). Las estructuras del hongo dentro de la raíz de la planta, están en contacto con

el micelio externo que rodea en una red difusa la raíz, lugar en donde son formadas, libremente o en esporocarpos, las azigosporas o clamidosporas del hongo.

Su taxonomía se basa en las diferencias de forma, contenido citoplasmático, color, tamaño y forma de germinación de las esporas, hifas de sustentación y estructuras subcelulares de la espora (paredes y membranas internas), (Gerdemann y Nicolson, 1963; Sieverding y Toro, 1988).

En el caso del género *Glomus* del latín, *Glomus* (bola de Hielo), hace referencia a la posible forma de un esporocarpo. El género fue descrito por Tulasne y Tulasne en 1845 (Stúrner y Morton, 1997), informándose la presencia de especies de este género en la mayoría del hábitat de la naturaleza. Tienen como característica que las clamidosporas nacen terminalmente en una hifa no diferenciada (raras veces dos o más), el poro de la hifa conectada es cerrado por un septo o por el engrosamiento de la pared (Sánchez de Prager., 1995).

2.4.1. Desarrollo de la simbiosis micorrízica arbuscular (MA).

La formación de la simbiosis MA es un proceso complejo, según Barea y col. 1991, citados por Rodríguez (2004), es caracterizado por distintos estadios del establecimiento del hongo, donde se distinguen las siguientes fases: (1) Germinación de la espora, la cual se ve estimulada por la presencia de los exudados radicales y está influenciada por determinados microorganismos del suelo y, fundamentalmente, por las condiciones físico - químicas del mismo, (2) formación del apresorio sobre las células epidérmicas, producto del aumento de la presión hidrostática en la zona apical de la hifa infectiva, (3) penetración radical a través de los pelos radicales o de las células epidérmicas, por la combinación de procesos mecánicos y enzimáticos, (4) crecimiento intercelular a partir de la hifa de penetración que se extiende entre las células de la epidermis hacia la corteza de la raíz, sin penetrar el sistema vascular ni los meristemas radicales, (5) desarrollo del micelio extramatricial en el suelo con la formación de las estructuras ramificadas de absorción, las que aumentan considerablemente la superficie de absorción de la planta y su capacidad para captar nutrientes y agua, (6) formación de arbusculos intracelularmente, con el consiguiente aumento en la superficie de contacto entre el hongo y la planta, también se pueden formar vesículas y células auxiliares, en dependencia de la especie fúngica y (7) formación de esporas, cerrándose el ciclo de vida de los HMA.

La simbiosis (MA) puede ser afectada por varios factores; entre ellos, la luz (Hayman, 1974; Furlan y Fortin, 1997), temperatura del suelo (Orozco, 1986; Daniels y Trappe,

1980), contenido de agua presente en el suelo (Daniels y Trappe, 1980; Strullu, 1991; Secilia y Bagyaraj, 1982), y pH del suelo (Fernández, 1999), entre otros.

2.4.2. Beneficios de la simbiosis micorrízica arbuscular (MA):

Las micorrizas arbusculares estimulan el crecimiento, desarrollo y nutrición de las plantas, especialmente en suelos de baja y moderada fertilidad; dichos efectos se deben a que la micorriza genera una multitud de ventajas para la planta micorrizada frente a una que no lo esté.

Entre los efectos positivos de las MA sobre las plantas está el incremento de su biomasa vegetal, la relación parte foliar-raíz y la captación y traslocación de nutrimentos. Dicho mejoramiento está directamente ligado con el intercambio bidireccional de carbono y fósforo de los simbioses, que a su vez, está influenciado por los genotipos del hongo, de la planta y las condiciones ambientales. Estos beneficios son mayores en suelos con baja fertilidad, o con problemas de equilibrio de nutrientes, y más aún, cuando el fósforo asimilable es deficiente (Gianinazzi - Pearson y Azcón, 1991; Silveira, 1992; Plenchette y *col.*, 1996). Uno de los cambios más importantes cuando se establecen las MA, es el que ocurre en la interfase raíz-suelo, pues el micelio extrarradical prolifera en el suelo más fácilmente que los pelos radicales. El micelio externo puede crecer en el suelo a una distancia considerable de la raíz, lo cual es un indicativo de que las MA incrementan la rizósfera, con los beneficios que esta conlleva a la planta (Orozco, 1988; Sieverding, 1988, Sylvia, 1997).

En la nutrición de la planta, el mayor aporte de los HMA ocurre cuando se trata de absorción, traslocación y transferencia de iones que se difunden lentamente y están presentes en bajas concentraciones en la solución del suelo, como es el caso del P, NH_4^+ , K, Zn, y Cu; entre otros (Lambert y *col.*, 1980). Aunque se ha comprobado que los hongos micorrízicos arbusculares absorben el P del mismo reservorio del que lo toman las plantas no micorrizadas, los cambios que suscita en la rizósfera la presencia de la MA, afectan indirectamente los procesos de fijación y solubilización de este nutrimento, así como la mineralización de la materia orgánica que puede influir sobre los microorganismos del suelo presentes en la micorrizósfera.

El balance nutricional que promueve la presencia de MA en términos de macro y micronutrientes puede conducir a que plantas micorrizadas toleren mejor condiciones adversas, sin que ello signifique que alcancen alta productividad, si sus genomas no están adaptados para resistir estos tipos de estrés. Bajo condiciones de estrés abiótico, como baja humedad, las plantas micorrizadas son más tolerantes, se recuperan más

rápido del marchitamiento y hacen un uso más eficiente del agua absorbida (Azcón y col., 1991; Bethlenfalvay, 1992).

Se ha demostrado que algunos HMA exudan auxinas, giberlinas, citoquininas (Gianinazzi-Pearson y Azcón-Aguilar, 1991; Smith y col., 1999), y estimulantes, tales como, las argininas, que son hormonas que median la relación simbiótica en su formación y en el establecimiento de los arbusculos.

Las poblaciones de microorganismos fijadores de nitrógeno: libres y simbióticos, se ven favorecidas por la presencia de HMA, de ahí que la asociación incrementa las poblaciones de *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Rizobium* (Sieverding, 1991). Las micorrizas arbusculares contribuyen con la recuperación de suelos por ser formadoras de agregados, incrementando la respiración del suelo, también debido a la mineralización de nutrientes y al aporte de sustratos orgánicos, especialmente por exudación radical. Estas condiciones estimulan a la microbiota y sus componentes, a su vez, desarrollan acciones que afectan a la nutrición y la salud vegetal (Barea y col., 1991; Sieverding, 1991; Barea y Jeffries, 1995).

La biofertilización con HMA constituye una valiosa alternativa en el desarrollo de los cultivos, debido a su efecto positivo en la absorción de nutrientes, posibilitando el incremento de los rendimientos en diferentes cultivos y condiciones agroproductivas (Medina, 1994; Pulido y Peralta, 1996b; Novella y Medina, 1998).

2.4.3. Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y su papel en la “protección” de las plantas.

En situaciones de estrés biológico, los HMA incrementan la resistencia de las plantas al ataque de los patógenos, en especial, los que atacan la raíz, cuando ocurre su establecimiento previo al ataque del patógeno. En el caso de algunas enfermedades que atacan tallos y hojas, causadas por virus, hongos o bacterias, la presencia de las MA puede incrementar su presencia; a pesar de ello, las plantas micorrizadas sufren menos daño que las plantas no micorrizadas (Sánchez de Prager., 1995).

En estudios de enfermedades causadas por *Pythium*, *Phytophthora*, *Fusarium* y *Verticillium*, se logró demostrar la reducción de los efectos patogénicos, cuando las raíces estaban colonizadas por HMA (Rosendhal y col., 1992). En el caso de nematodos fitoparásitos, se ha registrado que los HMA reducen su incidencia y el daño causado es, a menudo, compensado por el incremento en el sistema radical y en el micelio externo del hongo, por lo tanto, en la absorción de nutrimentos (Sánchez de Prager y Sieverding, 1997 citado por López R. Carol, 2003).

En el último caso, la dependencia obligada de los nematodos fitoparásitos, con relación a las plantas, para poder obtener alimento y reproducirse, resultaba en una asociación “obligada” de estos nematodos y los HMA, debido a que ambos cohabitan en la rizosfera, en estrecha relación con las raíces de las plantas, donde ambos grupos establecen diferentes tipos de interacciones Smith (1987).

El interés de los científicos en determinar los tipos de interacciones que se establecen entre nematodos y HMA, y su posible uso en el manejo de las poblaciones de estas plagas fue evidente desde hace más de 20 años. Al respecto, ya a finales de la década del los 80s, Caron (1989) publicó una revisión acerca del potencial de las micorrizas en el control de patógenos habitantes del suelo y señaló que, en el caso de los nematodos, la presencia de micorrizas puede disminuir, incrementar o no afectar las poblaciones de nematodos, sin embargo, se había observado que se producía un incremento en la tolerancia de plantas susceptibles a los nematodos y que esto era más que el resultado del aumento de los niveles de fósforo en la planta, producto de la acción de las micorrizas. Dicho autor señaló la necesidad de conocer acuciosamente el sistema (interacción) formado por la planta, patógenos y las micorrizas (las que a su vez, están relacionadas con el suelo y sus variables: microflora, tipo de suelo, contenido de agua, temperatura, pH, nivel nutricional). En la actualidad, numerosas hipótesis se han planteado para explicar los mecanismos relacionados con la reducción o aumento de la severidad de las enfermedades en las plantas micorrizadas y, dependiendo de la enfermedad y las condiciones ambientales, se plantea que varios mecanismos están relacionados (Smith y Gianinazzi-Pearson, 1988 citados por Naqvi y Naqvi, 2004).

En los últimos años se han postulado varias teorías para tratar de explicar las relaciones HMA - plagas, entre ellas, la susceptibilidad del hospedante a la infección y la tolerancia a la enfermedad es influenciado por el estado nutricional del hospedante y los niveles de fertilidad del suelo (Harrier y Watson, 2004). Otros autores señalan que la competencia por el espacio y fotosintatos del hospedantes podrían ser otras de las causas que explicaran la disminución de la micorrización o de las poblaciones de los patógenos (incidencia de las enfermedades), señalando Azcón-Aguilar y Barea, 1996 citados por Naqvi y Naqvi (2004) que los HMA, los patógenos fungosos y los fitonematodos ocupan los mismos tejidos radicales, lo que resulta en una competencia directa por espacio (Harrier y Watson, 2004).

En la literatura revisada se pudo constatar que tanto el hospedante (especie/variedad), las plagas involucradas y la especie/cepa del hongo micorrízico empleada, en los estudios hacen que las respuestas sean variadas, de ahí la importancia de efectuar

este estudio con cepas de organismos nativos con excelentes potencialidades como bioinsumos en el proceso tecnológico del cultivo del tomate, que debe arrojar elementos que permitan hacer recomendaciones a los productores.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del experimento, características edafoclimática del área y descripción de la unidad experimental (microplot).

El experimento se desarrolló en áreas del Instituto Nacional de Ciencias Agrícola (INCA), situado en San José de las Lajas, Provincia La Habana (138 m.s.n.m, 23° 00' de latitud Norte y 32° 12' de longitud Oeste), durante el periodo transcurrido entre el 18 de diciembre de 2006 y el 12 de marzo de 2007, siguiendo los pasos generales de trabajo que se presenta en el esquema representado en la Fig.1. Las evaluaciones realizadas durante el período experimental se reflejan en la Fig.2.

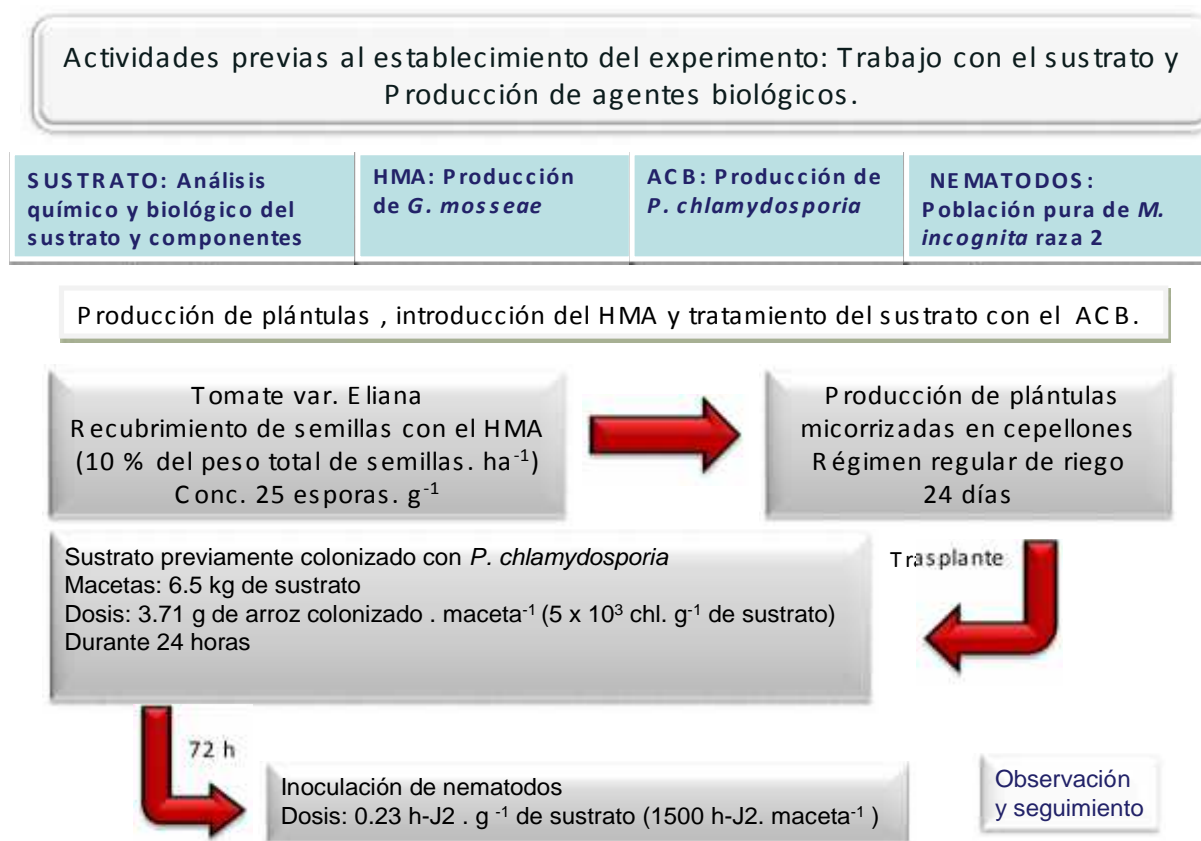


Fig. 1. Representación esquemática de las actividades y secuencia experimental durante el desarrollo de la investigación.



Fig.2. Evaluaciones realizadas en el experimento, durante la investigación.

Como unidad experimental se utilizaron macetas plásticas de 10 L de capacidad, las que fueron situadas en canaletas de asbesto cemento espaciadas a un metro, en cada una de las cuales se colocó una planta. (Fig. 3).



Fig.3. Vista del área experimental canaletas de asbesto cemento, levantada a 0.50 m del suelo conteniendo las macetas con el sustrato esterelizado (microplot).

Se realizó la recopilación de datos de las variables climáticas diarias en el transcurso del experimento utilizando el método de aproximación (donde la distancia del área experimental a la estación, es menor de 1 km), tomando como referencia la Estación Meteorológica número 78374, ubicada en el km 3½ de la carretera a Tapaste, Municipio San José de Las Lajas, Provincia La Habana. Se graficaron los valores registrados de las temperaturas (T) del aire, superficie del suelo, así como la humedad relativa (HR) (máxima, mínima y promedio), representados en las Fig. 4; 5 y 6. Con respecto a las precipitaciones, el promedio diario de esta variable en los 85 días del experimento fue de 0.43 mm, denotándose que fue un período seco.

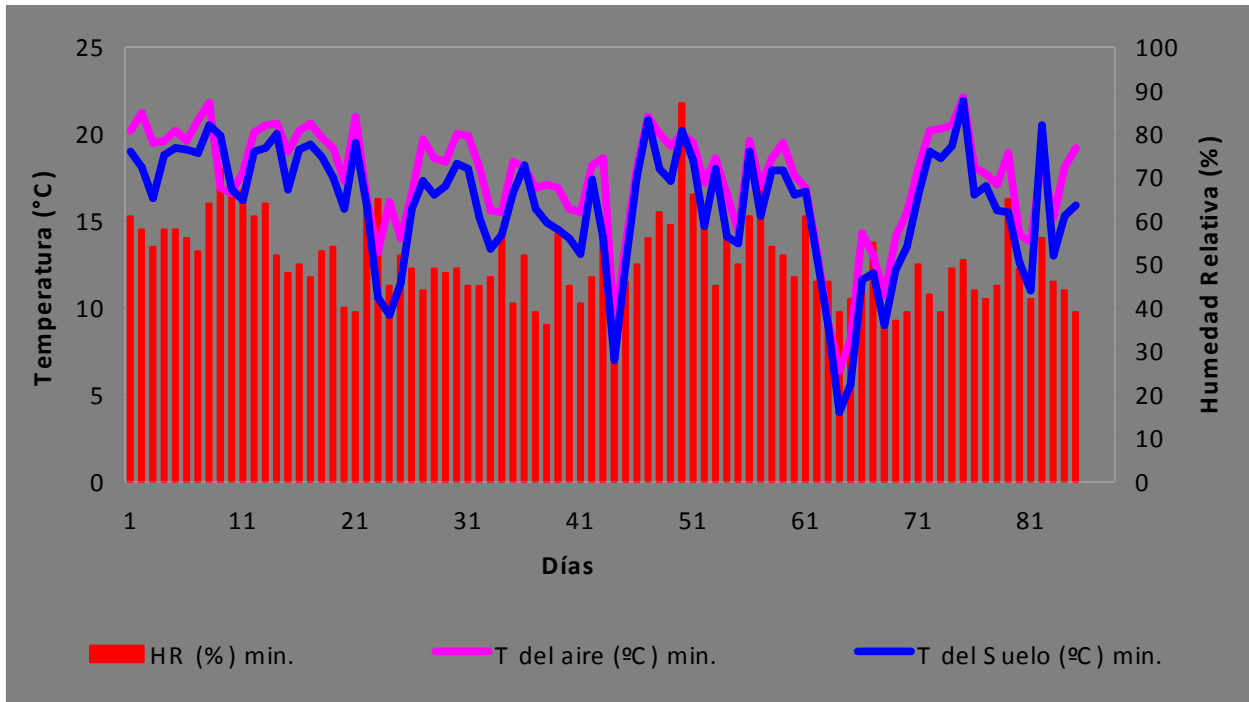


Fig. 4. Valores diarios de Temperaturas y Humedad Relativa mínima.



Fig. 5. Valores diarios de Temperaturas y Humedad Relativa máxima.

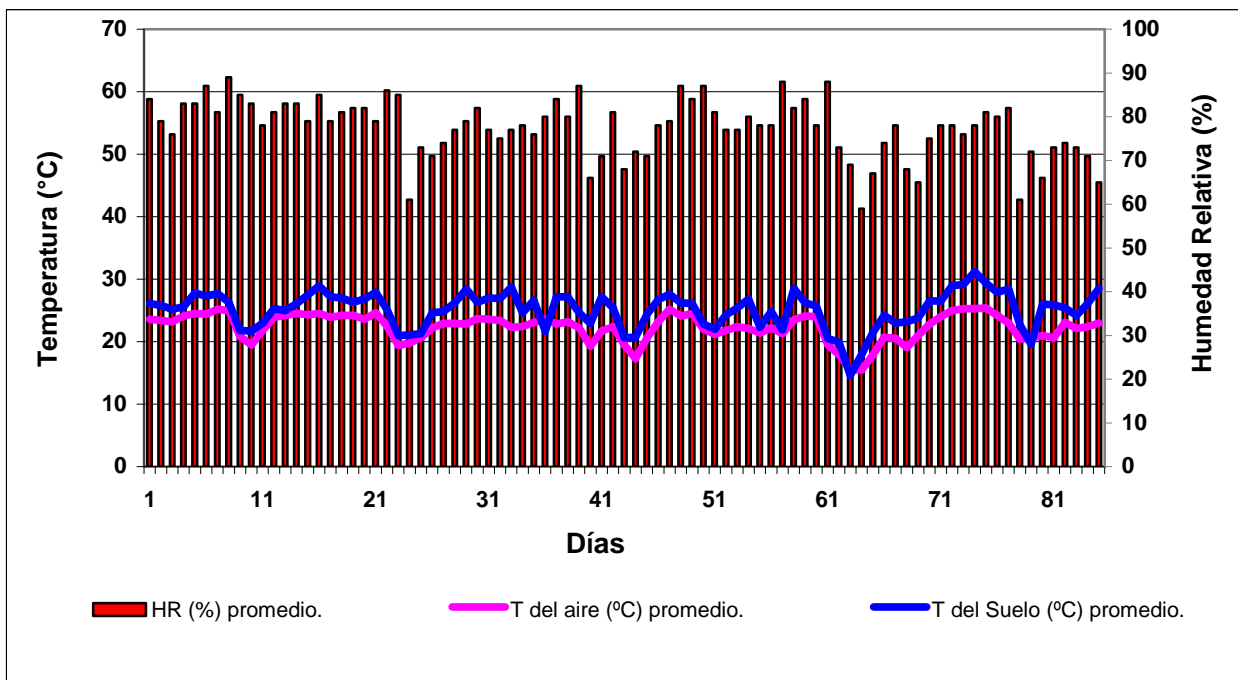


Fig. 6. Valores diarios de Temperaturas y Humedad Relativa promedio.

ACTIVIDADES PREVIAS AL ESTABLECIMIENTO DEL EXPERIMENTO: TRABAJO CON EL SUSTRATO Y PRODUCCIÓN DE AGENTES BIOLÓGICOS.

SUSTRATO:

- **Preparación y análisis físico – químico del sustrato.**

Tanto en las canaletas como en las macetas, se depositó un sustrato conformado por suelo Ferralítico Rojo lixiviado (Nitisol Ródico Eútrico) (Hernández y *col.*, 1999; FAO, 1999; Hernández y *col.*, 2005) y cachaza, en una relación 3:1 v/v. La cachaza era procedente del Complejo Agroindustrial “Boris L. Santa Coloma”, ubicado en el municipio de Madruga.

Se ejecutó la caracterización del sustrato después de conformado y de sus componentes, suelo y cachaza, por separado, mediante los métodos analíticos establecidos por las Normas Ramales (NRAG 1987; 1988) y lo recomendado por Paneque y *col.*, (1998; 2000), determinándose:

- pH en H₂O: Potenciometría. Relación suelo - solución: 1:2.5.
- Materia orgánica: Walkley y Black (%).
- N. asimilable (kg.ha⁻¹).
- P₂O₅: Oniani (mg.kg⁻¹).

- Cationes intercambiables: Extracción con NH_4AC 1 mol.L^{-1} a pH 7 y determinación por complexometría Ca y Mg y fotometría de llama Na y K (cmol.kg^{-1}).

Los resultados de dicho estudio se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Caracterización química del sustrato y de sus componentes.

Caracterización química del sustrato.									
Componentes	Na	K	Ca	Mg	P_2O_5 (mg.Kg^{-1})	M.O (%)	pH en H_2O		
Suelo + Cachaza	cmol.Kg^{-1}				273.3	10.6	6.9		
	0.22	1.13	13.8	4.4					
Caracterización química del suelo									
Componente	Na	K	Ca	Mg	P_2O_5 (mg.Kg^{-1})	M.O (%)	pH en H_2O	N (kg.ha^{-1})	CCB (cmol.Kg^{-1})
Suelo	cmol.Kg^{-1}				203	3.24	7.5	97	20.48
	0.10	0.19	16.0	3.20					
Caracterización química de la cachaza (%)									
Análisis	Na	K	Ca	Mg	P	M.O	N	pH en H_2O	Humedad en campo
Base seca	0.33	0.17	4.57	2.70	1.68	62.10	1.43	8.1	-
Base húmeda	0.29	0.15	4.09	2.17	1.33	49.3	1.13	8.1	16.4

La valoración de la fertilidad del sustrato refleja la presencia de pH en condiciones ligeramente ácidas, con contenidos altos de materia orgánica, fósforo asimilable y potasio cambiante, así como valores adecuados de Na, Ca y Mg, para el desarrollo del cultivo. (MINAGRI, 1980; Paneque y *col.*, 2001).

- **Evaluación biológica del sustrato, desinfección y verificación de la calidad de la desinfección.**

La eliminación de microorganismos nativos puede ser necesaria para evaluar las transformaciones efectuadas por ellos, o para estudiar el crecimiento o actividad metabólica de microorganismos específicos inoculados en el suelo (Wolf, 1994 citado por Covacevich, y Echeverría, 2003), de ahí la importancia del tratamiento y los análisis efectuados en esta fase del trabajo. Teniendo en cuenta que se llevaría a cabo la evaluación de organismos de suelo, era necesario realizar la desinfección y evaluación biológica del sustrato.

Análisis nematológico:

La mezcla de suelo + cachaza (sustrato) se conformó y se tomaron 8 muestras de 1 kg cada una para ser analizadas en el Laboratorio de Nematología Agrícola del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Posteriormente, el sustrato fue tratado con una solución de Formaldehído al 1% (50ml de Formol en 5 litros de H₂O.m² de sustrato⁻¹), tapándose posteriormente con polietileno transparente, durante una semana, para evitar el escape de los gases y favorecer el aumento de la temperatura, buscando una óptima desinfección del sustrato.

Culminado el tratamiento de desinfección, se tomaron otras 8 muestras de 1 kg para ser analizadas con vistas a comprobar su efectividad.

Las muestras tomadas previas al tratamiento y posteriores a este, fueron procesadas a través del método de Embudos de Baermann (Hooper, 1986) y para ello, de cada kg de sustrato se tomaron 3 sub-muestras de 10 g cada una para ser evaluadas. A las 72 h, se colectaron las muestras y fueron sometidas a tratamiento en Baño María a 66°C, 3 min y fijadas con TAF (solución compuesta por 2 ml de Trietenolamina, Formalina al 37% y 91 ml de agua destilada), según establece el PNO - PA - 058.

Las muestras fueron observadas en Microscopio Óptico Axioscop® 40, con 500 aumentos y utilizando una cámara de conteo se contabilizaron los especímenes de los géneros fitoparasíticos y el total de nematodos saprobióticos presentes.

El análisis de las muestras puso de manifiesto que la desinfección fue eficiente en el caso de los nematodos (Tabla 2), por lo que se procedió con el experimento.

Tabla 2. Representantes del Phylum Nematoda presentes en el sustrato (suelo + cachaza) antes y después de la desinfección con formalina.

Géneros y/o grupos	Promedio de Individuos por cada 10 g de sustrato	
	Antes de la desinfección	Después de la desinfección
<i>Helicotylenchus</i>	10.9	1
<i>Meloidogyne</i>	2.5	0.5
<i>Xiphinema</i>	0.58	0
Nematodos saprobióticos	14	1.8

Análisis micológico.

Para determinar la presencia en el sustrato de *Pochonia* spp. agente de control biológico (ACB) de nematodos formadores de agallas, se tomaron 8 muestras del área experimental antes y después de la desinfección.

Se utilizó la técnica de dilución y siembra en medio semi-selectivo establecida por Kerry y col. (1993), para lo cual se tomó 1 g de cada una de las muestras y se adicionaron 9 ml de una solución de agua agarizada al 0,05% en tubos de ensayos de 15 x 2.5 cm, agitándose varias veces en un agitador de tubos. A partir de la suspensión obtenida se prepararon diluciones seriadas de 10^{-1} y 10^{-2} , de las cuales se tomaron 0.2 mL y se vertieron de forma homogénea sobre placas Petri de 9 cm de Ø que contenían medio semiselectivo (dos placas.dilución⁻¹). Las placas se incubaron a 25°C durante 14 días, momento en que fueron evaluadas, observando la presencia y contabilizando la cantidad de Unidades Formadoras de Colonias (UFC).g⁻¹ de sustrato.

Con relación a hongos micorrízicos arbusculares, se determinó la presencia de esporas nativas y el género a que éstas pertenecían, en el sustrato que se utilizaría en el experimento a través de la técnica Conteo de esporas en suelo por el método de tamizado y decantado húmedo descrito por Gerdemann y col. (1963) y modificado por Herrera y col. (1995), establecida en el Departamento de Biofertilizantes y Nutrición de las plantas del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA).

Las determinaciones micológicas efectuadas antes y después de la desinfección confirmaron que no se encontraban estructuras de hongos del género *Pochonia* en el sustrato, por lo que se puede afirmar que el hongo encontrado al final del experimento y su efecto sobre *M. incognita* se debe a la cepa inoculada.

Por su parte, se pudo determinar dos aspectos con relación a los HMA, la existencia de *Glomus* sp. de forma nativa en este sustrato antes de la desinfección y el hecho de que la desinfección resultó efectiva, ya que se determinó que existía una media de 1293,4 esporas de *Glomus*. 50 g de sustrato⁻¹ y, de ellas, unas 1275 esporas estaban necrosadas luego del tratamiento, para una efectividad del tratamiento del 98.6%, lo que permitió confirmar que el sustrato estaba listo para el desarrollo del experimento.

HONGO MICORRÍZICO ARBUSCULAR (HMA):

- **Obtención del hongo micorrizógeno.**

El inoculante micorrízico (HMA) corresponde a *Glomus mosseae*, con el nombre INCAM-2 procedente del cepario del Departamento de Biofertilizantes y Nutrición de las Plantas del INCA que fue cultivada siguiendo el método establecido por Fernández y col. (2000) en la unidad de producción de micorrizas del propio instituto.

HONGO AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO (ACB):

- **Características del agente de control biológico y Obtención del inóculo fungoso.**

El bioproducto utilizado en el experimento, provino del lote No.311106 y se obtuvo según el protocolo descrito por Montes de Oca (2004), utilizando un sistema de gestión de la calidad bajo normas ISO 9000, en la Unidad de Investigación Desarrollo de Agentes de Control Biológico del CENSA. El certificado de calidad de dicho lote se muestra en el Anexo 1.

NEMATODOS FORMADORES DE AGALLAS:

- **Nematodos formadores de agallas: Especie y población utilizada. Reproducción del inóculo.**

La población de nematodos utilizada pertenecía a la especie *M. incognita* raza 2, proveniente de una instalación de producción protegida de tomate (híbrido HA 3019 de la firma HAZERA), enclavada en San José de las Lajas, La Habana. La misma fue identificada y caracterizada morfológica, fisiológica y molecularmente por Gómez (2007) y su selección estuvo basada en el hecho de que constituye la especie y raza más distribuida en el país (Fernández y col., 1998, Gómez, 2007).

Dicha población pura fue mantenida en los aisladores biológicos del CENSA sobre plantas de berenjena (*Solanum melongena* L. var. FHB-1), siguiendo lo descrito por Hartman y Sasser (1985).

PRODUCCIÓN DE PLÁNTULAS E INTRODUCCIÓN DEL HMA. TRATAMIENTO DEL SUSTRATO CON EL ACB.

- **Producción de las plántulas e inoculación del HMA.**

En el estudio se empleó tomate (*S. lycopersicum* var. Eliana). Este genotipo fue obtenido en el marco del programa de mejoramiento genético que ejecuta el INCA, a partir de la línea 100 del cruce Mariela x Rambo, con el gen *Mi* inducido (Álvarez y col., 2006).

Según Álvarez y col. (2004), la variedad Eliana fue evaluada en condiciones controladas con inóculo de *M. incognita*, junto a variedades controles susceptibles demostrando resistencia a *M. incognita*.

Las semillas se inocularon con *G. mosseae* mediante recubrimiento, siguiendo la metodología descrita por Fernández y col. (2000), se utilizó un volumen de inóculo correspondiente al 10% del peso de la semilla total por hectárea (ha^{-1}). El producto se mezcló con una cantidad de agua del 2% de la semilla total por ha^{-1} hasta formar una pasta donde se mezclaron las semillas, luego se sacaron, se esparcieron sobre un papel y se dejaron secar durante la noche en un lugar fresco para la siembra al día siguiente. El inóculo poseía una concentración promedio de $25 \text{ esporas.g}^{-1}$, según Gerdemann y Nicholson (1963), notificado por el laboratorio de Micorrizas del INCA.

Las semillas (recubiertas con micorrizas o no), se colocaron a germinar en bandejas de polietileno blanco con alvéolos (cepellones) de $2,9 \times 2,9 \times 6,5 \text{ cm}$ de dimensión, desinfectadas y lavadas con agua antes de su empleo, tal como establecen Casanova y col. (2003). Las bandejas se mantuvieron en un túnel modelo Carisombra con riego en días alternos y se ejecutaron observaciones semanales del estado fitosanitario, de modo que si aparecieran patógenos (hongos, artrópodos u otros) tomar las medidas pertinentes.

A los 24 días de haber germinado, las plántulas tenían unos 12 cm de altura (3 pares de hojas y con una buena altura y coloración) y se transfirieron a las macetas a plena exposición solar, a razón de una plántula.maceta⁻¹ (Fig. 7).



Fig. 7. Estado de las plantas de tomate en el momento del trasplante.

- **Inoculación del sustrato con *P. chlamydosporia* var. *Catenulata*, cepa IMI SD 187.**

Antes de trasplantar el tomate, el sustrato de los tratamientos donde se incluiría a *P. chlamydosporia* se inoculó con este organismo.

Para inocular los 6.5 kg del sustrato que se introdujeron en las macetas, este volumen se colocó previamente, en una bandeja plástica de 50 x 43 x 13 cm y se mezclaron con 3.71 g de arroz colonizado con el hongo (equivalente a 5000 clamidosporas del hongo.g⁻¹ de sustrato.macetas⁻¹) (Fig. 8). El sustrato tratado se colocó en las macetas de los tratamientos que lo requerían, 24 h antes de llevarse a cabo el trasplante.



Fig. 8. Inoculación del sustrato con *P. chlamydosporia* var. *Catenulata*, cepa IMI SD 187.

INOCULACIÓN DE NEMATODOS, SEGUIMIENTO Y EVALUACIÓN DEL EXPERIMENTO.

- **Inoculación de los nematodos formadores de agallas.**

Para preparar el inoculo de nematodos se empleó la metodología de Hussey y Barker (1973), obteniéndose una suspensión de huevos y juveniles de segundo estado (J2), que permitió inocular las macetas con 0.23 huevos-J2.g de sustrato⁻¹, equivalente a la introducción de 1500 huevos-J2.maceta⁻¹.

Para la inoculación, que se efectuó a las 72 h del trasplante, se retiró el suelo cercano a la zona radical (Fig. 9) y con una pipeta se añadió el volumen de la solución necesaria para garantizar el nivel de inoculo señalado anteriormente.



Fig. 9. Forma de inocular los nematodos en las macetas.

3.1. Estudio de la interacción *S. lycopersicum* var. *Eliana* - *G. mosseae* - *P. chlamydosporia* var. *catenulata*, y su impacto en el desarrollo de *M. incognita*.

El experimento quedó establecido el 18 de diciembre de 2006, bajo un diseño Completamente Aleatorizado, conformado por 6 tratamientos y 10 repeticiones por tratamientos (macetas) (Fig. 10). El riego del experimento se efectuó con micro-aspersores, siguiendo las normas establecidas para esta actividad (MINAGRI, 1984).

Los tratamientos quedaron conformados de la siguiente manera:

Tratamientos		Abreviaturas
1	Tomate (<i>S. lycopersicum</i>), variedad Eliana	Control absoluto (C)
2	Tomate + <i>Glomus mosseae</i>	Micorrizas (M)
3	Tomate + <i>Meloidogyne incognita</i> raza 2	Nematodos (N)
4	Tomate + <i>G. mosseae</i> + <i>M. Incognita</i>	Micorrizas + Nematodos (M + N)
5	Tomate + <i>M. incognita</i> + <i>P. chlamydosporia</i> var. <i>catenulata</i> , cepa IMI SD 187.	Nematodos + ACB (N + K)
6	Tomate + <i>G. mosseae</i> + <i>M. incognita</i> + <i>P. chlamydosporia</i> var. <i>catenulata</i> , cepa IMI SD 187.	Micorrizas + Nematodos + ACB (M + N + K)

Nota: P (*P. chlamydosporia*) es el ACB = K (KlamiC®) nombre del preproducto comercial.

La cosecha de los frutos, conteo y su masa se fue realizando a medida que estos llegaban a su madures fisiológica. Transcurridos 85 días, el cultivo llegó a su fase final y se desmontó el experimento. Se recolectaron todos los frutos que se mantenían en la planta y se separó, con la ayuda de un cuchillo, toda la biomasa foliar. Seguidamente, se extrajeron con cuidado las raíces, se lavaron con agua y se envolvieron en papel humedecido, e igualmente, se tomó muestras de 1 kg de suelo.macetas⁻¹ bien homogenizado. Se identificaron todas las muestras y se llevaron a los laboratorios para los análisis y las evaluaciones planificadas.



Fig.10. Vista general de área experimental en el INCA, donde se refleja la forma de riego y detalles del cultivo en la fase final.

3.1.1. Desarrollo de *M. incognita* raza 2 en tomate, var. Eliana.

- **Índice de agallamiento.**

El índice de agallamiento se calculó cuantitativamente por medio de la escala de 0 a 5 grados de Taylor y Sasser (1978). De acuerdo a la cual: grado 0, sin agallas; grado 1, de 1 a 10 agallas; grado 2, de 11 a 30 agallas; grado 3, de 31 a 50 agallas; grado 4, de 51 a 100 agallas y grado 5, más de 100 agallas, auxiliándose con una lupa de aumento y un estereo-microscopio óptico marca Zeiss con 50 aumentos.

Parámetros de Reproducción de *M. incognita* en *S. lycopersicum*, var. Eliana.

- **Masas de huevos (ootecas) por gramos de raíz.**

Para determinar la cantidad de masas de huevos, se pesó un gramo de raíces, se tiñeron durante 10 minutos con una solución de Phloxine B (15 mg.litro de agua⁻¹) (Barker y col., 1985). Con la ayuda del microscopio óptico marca Zeiss con 50 aumentos se contaron, sobre las raíces, las masas de huevos, promediándose el número de masas de huevos por g de raíz para cada tratamiento (# de masas y ootecas.g de raíz⁻¹).

- **Número de huevos por ooteca.**

A partir de esa muestra de un gramo se extrajeron manualmente, con la ayuda de una miniespátula y una pinza, las masas de huevos superficiales de las raíces, se colocaron 10 ootecas en una Siracusa con agua, se lavaron y se reañadió dos gotas de hipoclorito de sodio al 0.5% durante 3 minutos para romper la membrana protectora de las masas. Auxiliándose del microscopio óptico marca Zeiss con 50 aumentos se contaron los huevos viables (sin deformaciones o parasitismo) en una cámara de conteo de Peters y, posteriormente, se promedió el número de huevos por masas para cada tratamiento (# de huevos.ootecas⁻¹), método descrito por Hartman y Sasser (1985).

3.1.2. Evaluación de la colonización del sustrato y raíces de las plantas por *P. chlamydosporia* var. *catenulata* y capacidad parasítica sobre *M. incognita* raza 2 en las raíces *S. lycopersicum*, var. Eliana, colonizadas previamente con HMA.

El establecimiento del hongo en las raíces y el sustrato, así como la colonización de masas de huevos y el parasitismo de huevos de *M. incognita* raza 2, se determinaron según la metodología descrita por Kerry y Bourne (2002). Este estudio se ejecutó en la Unidad de Investigación Desarrollo de Agentes de Control Biológico del CENSA.

- **Colonización del sustrato.**

Se pesó 1 g del sustrato, previamente homogenizado, procedente de cada una de las macetas de los tratamientos donde estaba presente el hongo, continuándose el análisis micológico como se describe en el epígrafe 3, párrafos 1 y 2 de la página 32.

- **Colonización de las raíces.**

Las raíces se lavaron cuidadosamente con agua potable eliminando todo residuo del sustrato y se aerearon a temperatura ambiente durante 15 minutos. Posteriormente, se cortaron con unas tijeras en secciones de 1cm y se mezclaron para homogenizar la muestra. Se tomó una submuestra de 1g, la cual fue macerada suavemente en morteros de porcelanas con 9 mL de una solución de agua agarizada al 0.05%, el extracto jugoso concentrado se recogió en tubos de ensayos de 15 x 2.5 cm y se agitaron varias veces en un agitador de tubos. A partir de la suspensión obtenida se prepararon diluciones de 10^{-1} y 10^{-2} , de las que se tomaron 0.2 mL y se suspendieron de forma homogénea sobre dos placas Petri de 9 cm de Ø que contenían medio semiselectivo por cada dilución. Después de 14 días de incubadas las placas a 25°C en una incubadora refrigerada, se determinó la cantidad de UFC. g de raíz⁻¹.

- **Colonización de masas de huevos por *P. clamydosporia*.**

De las raíces, cortadas en segmentos de 1cm de longitud, se extrajeron manualmente con la ayuda de una miniespátula y una pinza, 10 ootecas que se encontraban superficiales en las raíces de cada planta (réplica). En un Flujo Laminar FASTER Bio48 y, auxiliándose de un asa microbiológica de siembra, se colocaron las masas de huevos en placas Petri de 9 cm de Ø que contenían agar agua con antibióticos y se incubaron a 25°C durante 5 a 7 días. Posteriormente se evaluaron las masas de huevos colonizadas, en un microscopio óptico Zeiss® con 200 aumentos, y se calculó el porcentaje de masas de huevos colonizadas, confirmadas por la presencia de clamidosporas y fiálides con microconidios en cadena, según la metodología descrita por Kerry y col., (2002).

- **Parasitismo de huevos.**

En un Flujo Laminar auxiliándose de un minirodillo de acero inoxidable se realizó la ruptura mecánica de 10 masas de huevos por planta (réplica), las cuales se añadieron en 1mL de agua estéril, preparándose una suspensión de huevos, de la que se extrajeron 0.2 mL y se extendieron de forma homogénea sobre dos placas Petri de 9 cm de Ø que contenían agar agua con antibióticos, según la metodología descrita por Kerry y col. (2002). Las placas se incubaron durante 72 h a 25°C en una incubadora refrigerada. Transcurrido ese tiempo, se observó al

microscopio óptico Zeiss® con 200 aumentos el crecimiento del hongo emergiendo de los huevos, caracterizado por la presencia de clamidosporas y fiálides con microconidios en cadena y se calculó el porcentaje de huevos parasitados.

3.1.3. Interacción de *G. mosseae* y *P. chlamydosporia* sobre la reproducción de *M. incognita* en tomate var. Eliana.

Los parámetros Índice de agallamiento (IA), número de ootecas por gramos de raíz y número de huevos.ooteca⁻¹ se determinaron como se describió en el epígrafe 3.1.1. Para determinar el tipo de interacción que se estableció entre *G. mosseae* y *P. chlamydosporia* se empleó lo recomendado por Koppenhofer (2003), quien establece la realización de un análisis de chi cuadrado, donde: $X^2 = (M_{AB} - M_E) / M_E$ y M_{AB} : efecto observado en el tratamiento combinado; M_E : efecto esperado, calculado como $M_E = M_{A+} M_B (1 - M_A)$.

Donde M_A y M_B son los efectos observados en los tratamientos con HMA y ACB por separado. Si X^2 calculado es menor que X^2 tabulado:

Efecto Aditivo. Si el valor es positivo, sinergismo y, si es negativo, antagonismo.

3.2. Comportamiento de la variedad de tomate Eliana en presencia de *G. mosseae*, *P. chlamydosporia* y *M. incognita*.

- **Desarrollo de *G. mosseae* en *S. lycopersicum* var. Eliana.**

Para el análisis de la simbiosis micorrízica, las raíces de las plantas, incluyendo las del control, fueron secadas a 70°C y teñidas mediante el método de Phillips y Hayman (1970).

Se evaluó el porcentaje de colonización a través del método de los interceptos (Giovannotti y Mosse, 1980) y la densidad visual (DV) según Trouvelot y col., (1986).

- **Evaluación de los parámetros vegetativos y los rendimientos.**

Los parámetros evaluados fueron: Masa fresca y seca de la raíz (g), masa seca de la parte aérea (g), y rendimiento (kg.planta⁻¹), utilizando una balanza técnica Sartorius®.

- **Determinación foliar de los contenidos de N, P y K.**

Al finalizar el experimento (85 días) se tomaron al azar tres plantas de cada tratamiento y se les realizó un análisis foliar a una muestra de cada planta a partir de una digestión en H₂SO₄, determinándole los porcentajes de N, P y K por los métodos de colorimetría y fotometría de llama (Paneque y col., 2001), establecidos en el INCA, posteriormente se calculó la extracción

de nutrientes a partir de la multiplicación por separado de los contenidos obtenidos de N, P y K por la masa seca de la biomasa aérea dividido entre 100.

3.3. Análisis Estadístico.

Para determinar la influencia de los tratamientos en los parámetros evaluados los datos se sometieron a un Análisis de Varianza Simple (ANOVA), y la comparación entre las medias se realizó mediante la prueba de rango múltiple de Duncan ($p < 0.05$). Los datos de porcentaje de densidad visual fueron transformados en arcsen % por no seguir una distribución normal, a través del paquete estadístico SAS (2004), versión 9.0.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Estudio de la interacción *S. lycopersicum* var. *Eliana* - *G. mosseae* - *P. chlamydosporia* var. *catenulata*, y su impacto en el desarrollo de *M. incognita*.

4.1.1. Desarrollo de *M. incognita* raza 2 en tomate, var. *Eliana*.

- Índice de agallamiento (IA).

Con relación al IA, se pusieron de manifiesto diferencias significativas entre los tratamientos (Fig. 11). Las plantas del tratamiento donde se inocularon los nematodos presentaron el índice de agallamiento mayor (IA=5), lo que es indicativo de un alta población (más de 100 agallas por sistema radical) de *M. incognita* raza 2 en las raíces de tomate variedad *Eliana*.

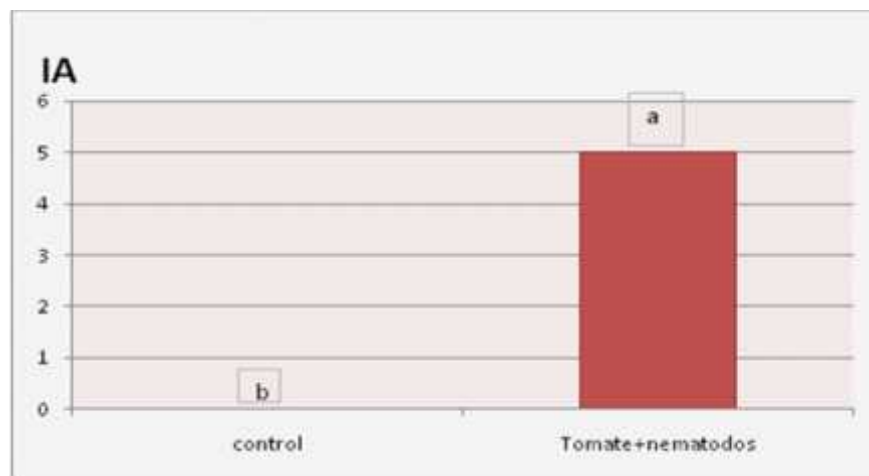


Fig. 11. Índice de agallamiento provocado por *M. incognita* en tomate var. *Eliana*. (letras desiguales difieren para $p < 0.05$).

Se conoce que la presencia o no de agallas en las raíces no debe ser tomado como indicativo de *susceptibilidad* y *resistencia*, respectivamente, señalando Gómez (2007) que se tiene que evaluar la reproducción, pues la resistencia a nematodos se expresa por el efecto del hospedante sobre la producción de huevos-larvas del organismo diana (Cook y Evans, 1987 citados por Gómez, 2007). Al respecto, según Canto-Sáenz, 1985 citado por Gómez (2007) la evaluación de la resistencia en base sólo al IA puede dar como resultado “malas interpretaciones” acerca de la resistencia de ciertos genotipos.

Torres y López, 1971 y Rodríguez, 2000, citados por Gómez (2007), señalaron que existen informes acerca de las relaciones de determinadas poblaciones de *Meloidogyne* spp., y sus hospedantes, donde no se producen agallas sino otros tipos de síntomas, de ahí la importancia de determinar si se produjo reproducción en esta variedad contentiva del gen *Mi*.

La formación de agallas en las raíces es un proceso que involucra un conjunto de factores donde están implicadas las características de la especie de nematodo fitoparásito y del

hospedante (Hussey y Crundler, 1998 citados por Gómez, 2007). En este sentido, se conoce que cuando los juveniles infestivos penetran la raíz y comienza la invasión de los tejidos vasculares de los cuales se alimentan, comienzan a producirse cambios morfológicos y fisiológicos en las raíces que van en contra de su funcionamiento y normal desarrollo y desembocan en la formación de las agallas.

Parámetros de Reproducción de *M. incognita* en *S. lycopersicum* var. Eliana.

Se conoce que cuando los juveniles de *Meloidogyne* spp., penetran una planta y se comienzan a alimentar, cada juvenil da origen a una hembra y esta a su vez, es capaz de producir unos 500 huevos (Ritter, 1973), por lo que el uso de genotipos susceptibles contribuirían a aumentar los niveles de nematodos en el suelo.

- **Masas de huevos (ootecas) por g de raíz⁻¹.**

En el tratamiento donde estaban las plantas de tomate de la variedad Eliana inoculadas con nematodos se produjo una media de ootecas.gramo de raíz⁻¹ de 22, lo que equivale a que una media de 22 hembras se encontraban en cada gramo de raíz, produciendo en mayor o menor medida huevos de *M. incognita*. El número de ootecas o masas de huevos se corresponde con el número de juveniles que penetraron en un segundo ciclo del nematodo y se convirtieron en hembras adultas.

- **Número de huevos por ootecas.**

El mayor número de huevos.ooteca⁻¹ se produjo en tomate var. Eliana inoculada con *M. incognita*, con un promedio de 381 huevos.ooteca⁻¹, valor que se encuentra dentro del intervalo de huevos.ooteca⁻¹ para hospedantes susceptibles, donde se pueden encontrar entre 250 a 500 y hasta un máximo de 1500 huevos por cada hembra adulta (Ritter, 1973; Ornat y Sorribas, 2008).

A las plantas que permiten la libre reproducción de los nematodos en sus tejidos se les conoce como susceptibles. La eficiencia del hospedante esta también sujeta a la influencia del ambiente, aunque usualmente en un menor grado, excepto cuando las temperaturas son elevadas que pueden ir en contra de la efectividad de la resistencia (Cook y Starr, 2006), lo que sin dudas ocurrió en este estudio.

La reproducción de *M. incognita* en las raíces del tomate sugiere que el gen *Mi* que posee la variedad Eliana se inactivó en correspondencia con las altas temperaturas del sustrato que se produjeron en el período en que se desarrolló el experimento, las que tuvieron límites inferior y superior de 14.6°C y 31.2°C, respectivamente, y una media de todo el período de 25°C y donde la temperatura del sustrato estuvo por encima de 27°C durante 22 de los 85 días que duró el experimento (ver Fig. 5 y 6). Al respecto se conoce que, el gen *Mi* se

inactiva a temperaturas por encima de 28°C (Cook y Starr, 2006; Dropkin, 1969 citados por Ornat y Sorribas, 2008) lo que constituye una de sus limitantes para su explotación en el trópico, de ahí la importancia de valorar la incorporación de agentes biológicos que contribuyan a disminuir el impacto del nematodo en la variedad en condiciones de producción.

4.1.2. Evaluación de la colonización del sustrato y raíces de las plantas por *P. chlamydosporia* var. *catenulata* y capacidad parasítica sobre *M. incognita* raza 2 en las raíces *S. lycopersicum* var. Eliana, colonizadas previamente con HMA.

- **Colonización del sustrato.**

Se pudo apreciar que *P. chlamydosporia* var. *catenulata* se estableció y proliferó en el sustrato y no se presentaron diferencias significativas en la cantidad de UFC de *P. chlamydosporia* en el sustrato en los tratamientos donde este ACB se aplicó solo o donde estaba presente también *G. mosseae* aplicado a través del recubrimiento de las semillas de tomate, variedad Eliana, con valores de $4,95 \times 10^4$ y $4,80 \times 10^4$ UFC.g⁻¹ de sustrato, respectivamente, siendo ligeramente mayor en el tratamiento con el ACB solo (Fig. 12). Similares resultados obtuvieron Rao y col (1997) y Puertas y col. (2006) al evaluar las interacciones de *P. chlamydosporia* con *G. deserticola* y *G. clarum*, respectivamente.

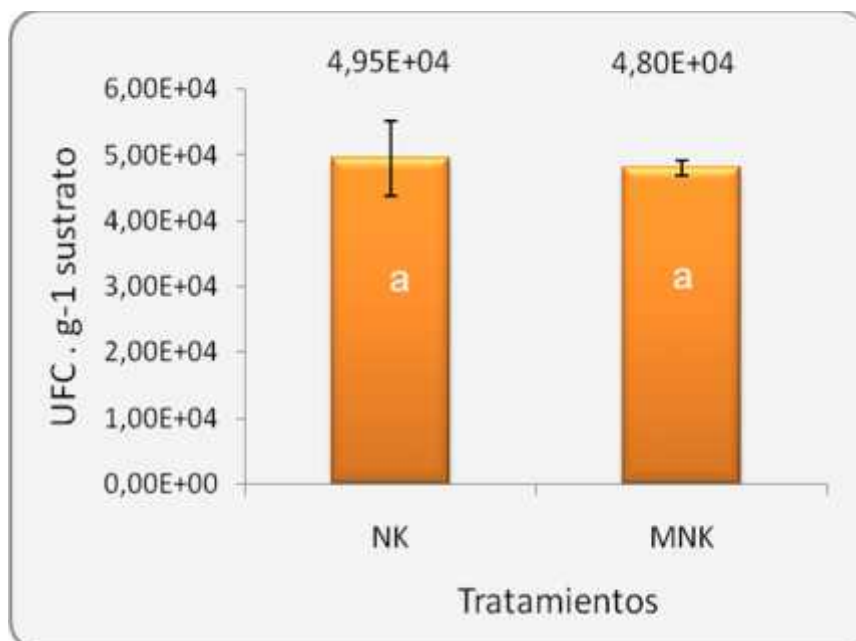


Fig. 12. UFC.g⁻¹ de sustrato de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* en los tratamientos con aplicaciones simples y combinadas con *G. mosseae* en presencia de *M. incognita* raza 2. Barras con letras distintas presentan diferencias significativas para p 0.05.

Leyenda: C: control (Tomate var. Eliana); M: *Glomus mosseae*; N: *Meloidogyne incognita* raza 2; K: *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* cepa IMI 187.

- **Colonización de las raíces**

En el análisis de las raíces se pudo constatar que la cantidad de UFC de *P. chlamydosporia* en las raíces fue significativamente mayor en el tratamiento donde el hongo estaba solo, con respecto al tratamiento donde estaba junto a *G. mosseae*, con valores de $1,38 \times 10^4$ y $9,54 \times 10^3$ UFC.g⁻¹ de raíz, respectivamente, indicando que la presencia del HMA en las raíces del hospedante produjo una afectación en cuanto a la colonización de las raíces por el ACB (Fig. 13).

Estos resultados no coinciden con Puertas y col. (2006), quienes no obtuvieron diferencias significativas en la colonización de la rizosfera por la misma cepa *P. chlamydosporia* var. *Catenulata*, cuando esta se aplicó al sustrato solo o combinada con *G. clarum*. Sin embargo, en el estudio de Siddiqui y Akhtat. (2008), cuando inocularon al mismo tiempo *G. intraradices* con *P. chlamydosporia*, la presencia del ACB produjo una ligera disminución en la colonización de las raíces por parte del HMA.

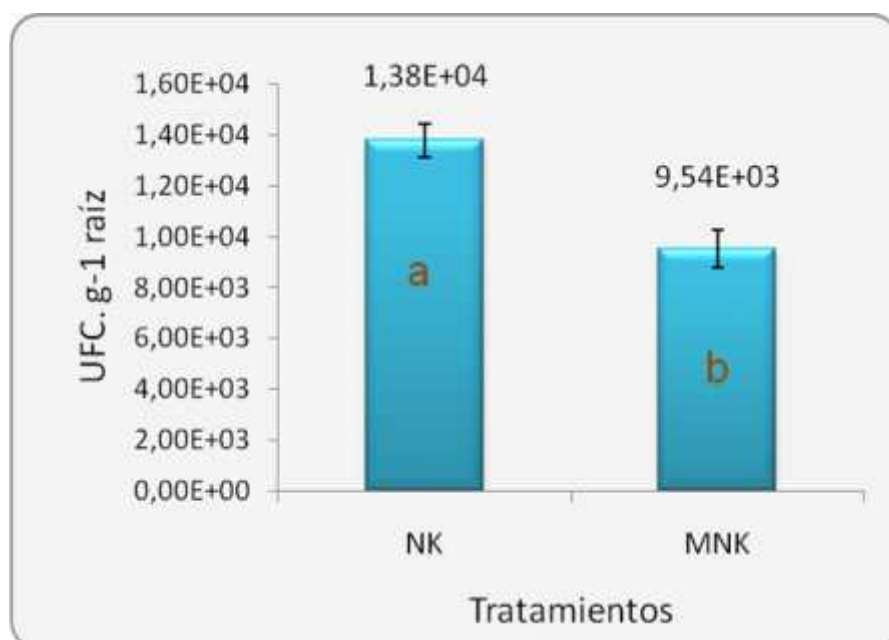


Fig. 13. UFC.g⁻¹ de raíz de *P. chlamydosporia* var. *Catenulata* en los tratamientos con aplicaciones simples y combinadas con *G. mosseae* en presencia de *M. incognita* raza 2. Barras con letras distintas presentan diferencias significativas para p 0.05.

Leyenda: C: control (Tomate var. Eliana); M: *Glomus mosseae*; N: *Meloidogyne incognita* raza 2; K: *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* cepa IMI 187.

La disminución en la colonización de las raíces observada en este trabajo puede estar relacionada con el hecho de que el HMA colonizó primero estas estructuras al ser inoculado

a través del recubrimiento de las semillas y, de ese modo, se establece una competencia por el espacio.

- **Colonización de masas de huevos por *P. chlamydosporia*.**

La colonización de ootecas por *P. chlamydosporia* se vió afectada por la presencia de *G. mosseae* en las raíces de las plantas de tomate (Fig. 14), produciéndose diferencias significativas entre los tratamientos. Los mayores valores de colonización de ootecas por ACB se produjeron en el tratamiento donde este hongo estuvo solo.

Este resultado puede estar ligado al hecho de que la cantidad de UFC en raíces se vió disminuida por la presencia del hongo micorrízico. En el estudio de Siddiqui y Akhtar (2008) se produjo una disminución del porcentaje de colonización de los hongos *P. chlamydosporia*; *T. harzianum* y *Gliocladium virens* en presencia de *G. intraradices*, mientras que este parámetro no fue afectado en *P. lilacinus*.

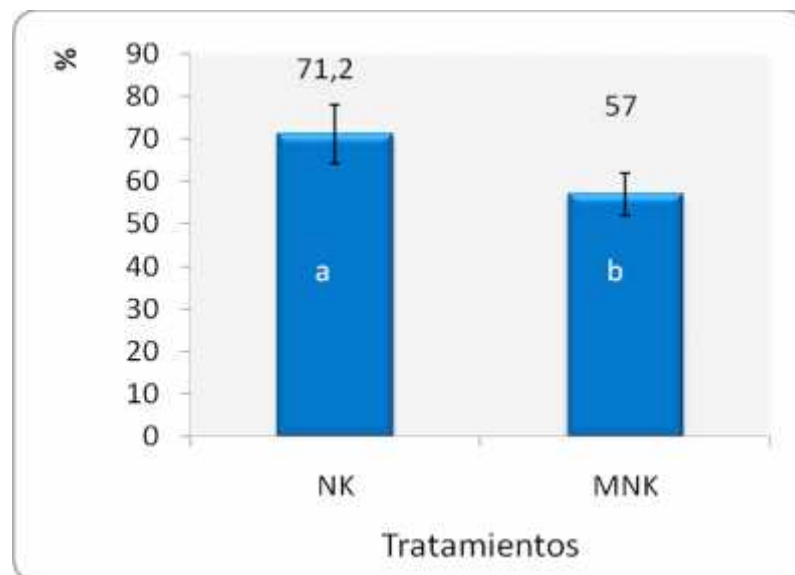


Fig. 14. Porcentaje de Colonización de Ootecas por *P. chlamydosporia* var. *catenulata* en los tratamientos con aplicaciones simples y combinadas con *G. mosseae* en las raíces de *S. lycopersicum* var. Eliana, en presencia de *M. incognita* raza 2. Barras con letras distintas presentan diferencias significativas para $p < 0.05$.

Leyenda: C: control (Tomate var. Eliana); M: *Glomus mosseae*; N: *Meloidogyne incognita* raza 2; K: *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* cepa IMI 187.

- **Parasitismo de huevos por *P. chlamydosporia*.**

El parasitismo de huevos de *M. incognita* se vió también afectado por la presencia de *G. mosseae* (Fig. 15). El parasitismo fue significativamente menor en el tratamiento donde estaban el ACB y el HMA, donde este valor fue de sólo 25%.

Al estar disminuida la presencia del hongo ACB en las raíces por la presencia del HMA, es menor la posibilidad de que se produzca parasitismo de los huevos que están protegidos en las ootecas, este resultado está también en correspondencia con la disminución en los valores de colonización de ootecas que se muestran en este estudio.

En el estudio llevado a cabo por Puertas y col. (2006) no se produjo este efecto, en el tratamiento donde *G. clarum* (*G. mosseae*) y *P. chlamydosporia* estaban presentes los valores de colonización de ootecas y parasitismo de huevos no difirieron de los producidos en el tratamiento donde el ACB estaba solo, lo que pudiera estar debido a que los métodos de inoculación del HMA y ACB fueron diferentes al empleado en este estudio. Dichos autores colonizaron con el ACB el sustrato de los cepellones e incorporaron el HMA al momento del trasplante, lo que garantizó la temprana colonización del sustrato y raíces por parte del ACB.

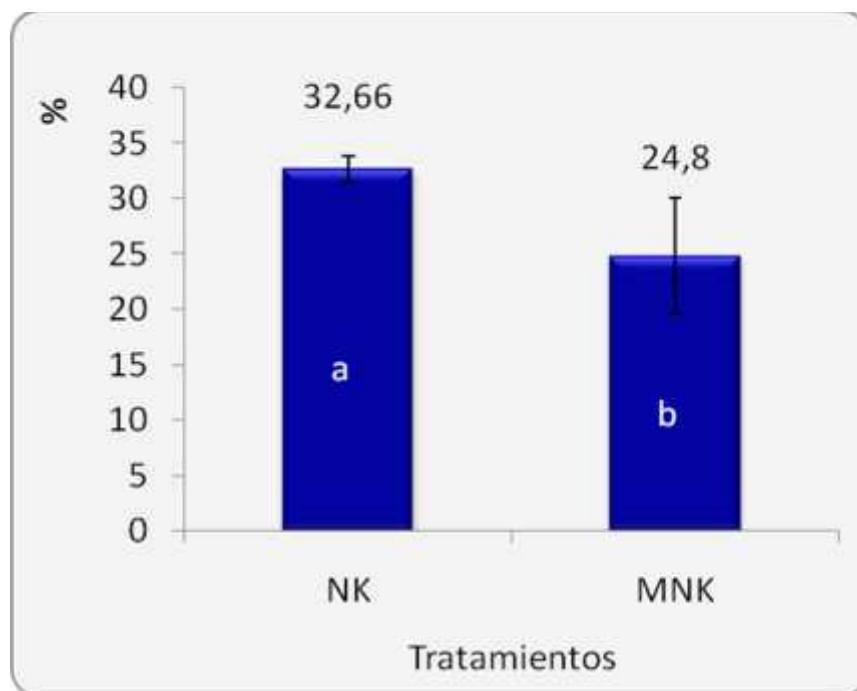


Fig. 15. Porcentaje de Parasitismo de huevos por *P. chlamydosporia* var. *Catenulata* en los tratamientos con aplicaciones simples y combinadas con *G. mosseae* en las raíces de *S. lycopersicum* var. Eliana, en presencia de *M. incognita* raza 2. Barras con letras distintas presentan diferencias significativas para $p < 0.05$.

Leyenda: C: control (Tomate var. Eliana); M: *Glomus mosseae*; N: *Meloidogyne incognita* raza 2; K: *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* cepa IMI 187.

Los resultados mostrados sugieren que el ACB sea introducido al sustrato tan pronto se incorpore también el HMA, de modo de minimizar la competencia entre ambos, aspecto que sin dudas debe ser abordado en estudios posteriores.

4.1.3. Interacción de *G. mosseae* y *P. chlamydosporia* sobre la reproducción de *M. incognita* en tomate var. Eliana.

El análisis de chi cuadrado (Koppenhofer, 2003) arrojó que el valor de este tabulado era de 3.84 (95% de confianza y 1 grado de libertad) y que X^2 calculado del Índice de agallamiento (IA) fue de 1.8, X^2 calculado en ooteca.gramo fue de 4, mientras que X^2 calculado de huevos.ooteca fue de -9.93. Teniendo en cuenta estos valores, se determinó que se establece una interacción del tipo sinérgica entre *G. mosseae* y *P. chlamydosporia* en dos de los parámetros (ÍA y número de ootecas.gramo de raíz⁻¹), mientras que en el número de huevos.ooteca⁻¹, se establece antagonismo.

- **Índice de agallamiento (IA).**

Con relación al IA, se pusieron de manifiesto diferencias significativas entre los tratamientos (Fig. 16). El tratamiento donde se inocularon los nematodos presentó el mayor índice de agallamiento (IA=5), mientras que el menor índice de agallamiento se presentó en el tratamiento donde se inocularon el HMA y el ACB (IA=2.2).

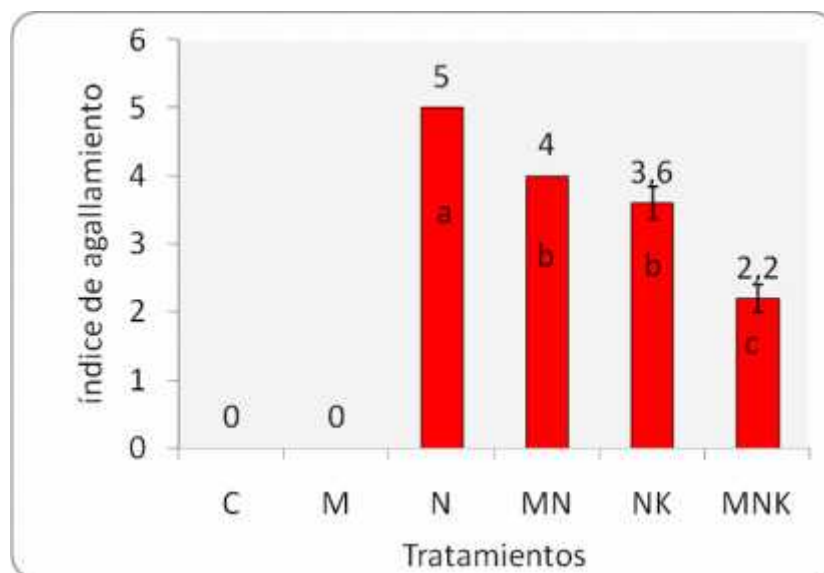


Fig. 16. Índice de agallamiento producido por la infestación de *M. incognita* raza 2 en las raíces de *S. lycopersicum* var. Eliana. Barras con letras distintas presentan diferencias significativas para $p < 0.05$.

Leyenda: C: control (Tomate var. Eliana); M: *Glomus mosseae*; N: *Meloidogyne incognita* raza 2; K: *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* cepa IMI 187.

La presencia del HMA y el ACB provocaron disminuciones en el porcentaje del IA de entre 20% (*G. mosseae*) a 56% (*G. mosseae* + *P. chlamydosporia*), lo que deberá traducirse en un mejor estado sanitario y nutricional de las plantas.

Al respecto, Kesba y Al-Sayed (2005) informaron que la media del número de agallas por sistema radical disminuyó de 902 (*M. incognita*) a 538 (*M. incognita* + *G. macrocarpus*) con diferencias significativas en vid (*Vitis vinifera* cv. Thompson), y en el tratamiento con *Glomus* se produjo una reducción del 40% de la población del nematodo. De igual modo, Castillo y col. (2006) informaron que el establecimiento en las raíces de *G. intraradices*, *G. mosseae* o *Glomus viscosum* en plantas de olivo antes de ser inoculados con *Meloidogyne* spp. redujo el agallamiento entre 6.3 – 36.8%.

La disminución del IA a 2.2 grados equivale a menor infestación en las raíces del tomate, lo que posee implicaciones muy favorables desde el punto de vista práctico. Similares resultados obtuvieron Siddiqui y Akhtat (2008), cuando en el tratamiento donde aplicaron juntos *G. intraradices* con *P. chlamydosporia*, el número de agallas fue de 40 agallas, mientras que en el tratamiento control (sin los microorganismos) fue de 90 agallas. De igual modo, Rao y col. (1997), observaron que el número de agallas fue menor en el tratamiento donde *G. deserticola* y *P. chlamydosporia* actuaban juntos, lo que sugiere que ambos organismos poseen un efecto sobre *M. incognita*, provocando un menor IA.

También el uso de HMA y bacterias parásitas de nematodos han provocado este tipo de efecto en el IA, señalando Rao y col. (2000) que se produjo una disminución significativa de este parámetro y la población de *M. incognita* en tomate cuando utilizaron *G. mosseae* y *P. penetrans*.

Por otra parte, cuando las micorrizas actuaron solas, se produjo disminución significativa del IA con relación al testigo con nematodos solos. Este efecto ha sido observado también por diversos autores. Al respecto, la disminución en el número de agallas en presencia de *G. fasciculatum* fue observada en tomate cuando se inocularon *M. incognita* y *M. javanica* por Bagyaraj y col. (1979). Este efecto fue informado también por Kellam y Schenck (1980), cuando inocularon *G. macrocarpum* en soya y se logró disminuir el número de agallas ocasionadas por *M. incognita*. De igual forma, el agallamiento provocado por esta especie de nematodo fue menor en plantas de pimiento inoculadas con *G. fasciculatum* y *G. etunicatum* (Sivaprasad y col., 1990).

En Kenya, experimentos llevados a cabo por Waceke y col. (2001), mostraron que se produjo disminución significativa del IA provocado por *M. hapla* en plantas de crisantemo (*Chrysanthemum cinerariifolium* Vis.) cuando se aplicó *G. etunicatum*, disminuyendo también el número de hembras y de huevos producidos.

La explicación, del por qué se producen disminuciones en el IA está relacionada con la combinación de los mecanismos de acción de ambos microorganismos (HMA y el ACB).

- **Masas de huevos (ootecas) por g de raíz.**

La menor cantidad de masas de huevos u ootecas viables se produjeron donde estaban juntos el HMA y el ACB, con diferencias significativas con los otros tres tratamientos, los que no difirieron entre si (Fig. 17). No obstante, en los dos tratamientos donde se encuentra el HMA se produjeron los menores valores de masas de huevos u ootecas, lo que sugiere cierto efecto protector sobre la raíz del hongo micorrízico desde el inicio del estudio, donde su presencia en las raíces puede haber limitado la entrada de juveniles y por tanto, como consecuencia, se presentara menor número de hembras adultas que produjeran huevos en el segundo y tercer ciclo del nematodo (a los 85 días cuando se evaluó el experimento).

Un elemento llamativo es el hecho de que el mayor número de ootecas.g⁻¹ de raíz se presentó en el tratamiento con el ACB solo. Estos resultados coinciden con los informados por Rao y col. (1997) acerca del hallazgo de que el mayor número de ootecas se presentó en el tratamiento con *V. chlamydosporium* (*P. chlamydosporia*) solo y el menor con la combinación del hongo control biológico y *G. deserticola*.

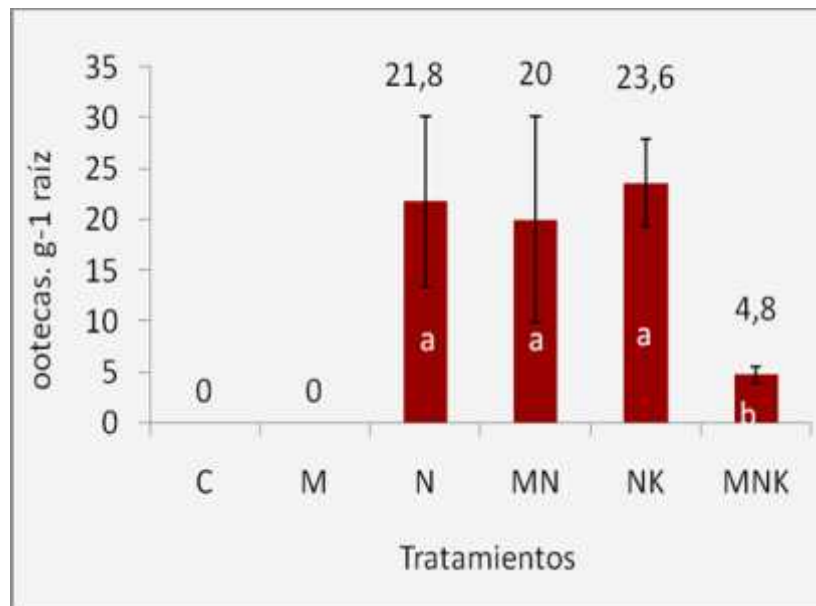


Fig. 17. Número de Ootecas.g⁻¹ de Raíz producidas por *M. incognita* raza 2 en las raíces de *S. lycopersicum* var. Eliana. Barras con letras distintas presentan diferencias significativas para p 0.05.

Leyenda: C: control (Tomate var. Eliana); M: *Glomus mosseae*; N: *Meloidogyne incognita* raza 2; K: *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* cepa IMI 187.

- **Número de huevos por ootecas.**

El mayor número de huevos.ooteca⁻¹ se produjo en tomate var. Eliana inoculado con *M. incognita* sin los hongos (control biológico y micorrizógenos), donde el número medio fue de 381 huevos.ooteca⁻¹ (Fig. 18). Por su parte, los valores menores en cuanto a la cantidad de huevos.ooteca⁻¹ se produjeron en el tratamiento con *P. chlamydosporia*, seguidos de los tratamientos con el HMA y la combinación del HMA y el ACB. En los tratamientos donde estaban *G. mosseae* solo y este combinado con *P. chlamydosporia* exhibieron valores intermedios de 231 y 227 huevos.ooteca⁻¹, respectivamente, sin diferir estadísticamente.

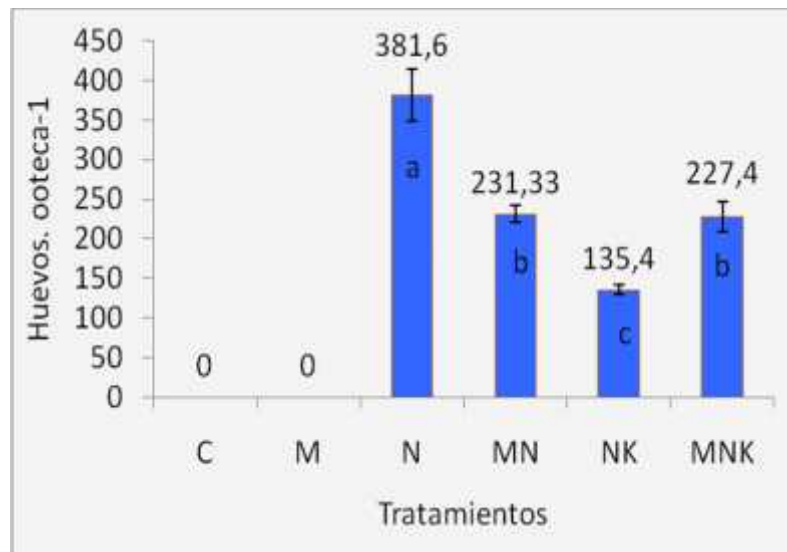


Fig. 18. Número de Huevos.Ooteca⁻¹ producidas por *M. incognita* raza 2 en las raíces de *S. lycopersicum* var. Eliana. Barras con letras distintas presentan diferencias significativas para $p < 0.05$.

Leyenda: C: control (Tomate var. Eliana); M: *Glomus mosseae*; N: *Meloidogyne incognita* raza 2; K: *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* cepa IMI 187.

Con relación a la acción de *P. chlamydosporia*, se constató que el menor número de huevos.ooteca⁻¹ fue el del tratamiento donde estaba el ACB, lo que podría estar relacionado con la facultad de este hongo nematófago de atacar y parasitar los huevos inmaduros (Kerry, 2000). Por su parte, numerosos autores han informado el efecto negativo de diferentes especies y cepas de micorrizas sobre la reproducción de diversas especies de nematodos fitoparasíticos. Así, tenemos que las especies *G. mosseae*, *G. fasciculatum*, *G. etunicatum*, *Gigaspora margarita*, *G. intraradicens* han ejercido efecto sobre la reproducción de especies de nematodos tan diversos como *R. reniformis*, *M. incognita*, *Heterodera cajani*, *R. similis* y *P. coffeae* (Sitaramaiah y Sikora, 1982; Hussey y Roncadori, 1982; Smith y col., 1986; Jain y Sethi, 1987; Elsen, 2002; Siddiqui y Akhtar, 2008).

A pesar de que el tipo de interacción entre *G. mosseae* y *P. chlamydosporia* no fue sinérgica para todos los parámetros evaluados, el balance fue positivo en lo relativo al manejo de los nematodos, pues la combinación de la disminución en el número de ootecas y de huevos.ootecas⁻¹ redundará en la disminución de las poblaciones con el tiempo, lo cual es un efecto esperado cuando se combinan tácticas u organismos en un programa MIN, y avala la inclusión de ambos agentes biológicos en el manejo de la variedad en condiciones de campo, donde la existencia de poblaciones naturales de *Meloidogyne* es condición permanente en las áreas tropicales.

4.2. Comportamiento de la variedad de tomate Eliana en presencia de *G. mosseae*, *P. chlamydosporia* y *M. incognita*.

- **Desarrollo de *G. mosseae* en *S. lycopersicum* var. Eliana.**

Los mayores valores de colonización micorrízica y densidad visual se obtuvieron en el tratamiento donde se inoculó *G. mosseae*, lo que demuestra que se produjo un nivel de micorrización en las raíces de la variedad de tomate por esta cepa, e incluso se produjo micorrización de la variedad por las micorrizas nativas que no se destruyeron o inactivaron con el tratamiento de formalina, lo que podría sugerir que la variedad Eliana se comporta como un hospedante favorable para especies del género *Glomus* (Tabla 3).

Aún cuando Bonfante y Perotto, 1995 citados por Rivera y Fernández (2003), señalaron que en presencia de las raíces del hospedante y condiciones favorables, los HMA pueden colonizar entre el 60 y 90% del sistema radical, lo cierto es que en la revisión de la literatura se encontró diversos criterios, donde otros autores han señalado que valores de hasta 30% son comunes.

En diversos estudios se consideran normales o adecuados, parámetros de 50 a 60% de colonización (Rodríguez y Gómez, 2008; Noval, 2008), mientras otros autores como Fernández y col. (2006), señalan que en la mayoría de los trabajos realizados en micorrizas con inoculantes sólidos, presentan valores de micorrización entre 20 y 45 % de colonización. Así, por ejemplo, en el estudio de Rodríguez y col. (2004) cuando evaluaron en macetas que contenían un sustrato conformado por suelo + cachaza con una relación 3:1, diferentes especies/cepas de *Glomus* en tomate var. Amalia, informaron que los porcentajes de colonización estuvieron entre 15 y 24%, lo que sitúa a los resultados de este trabajo dentro del rango, por lo que se considera adecuada la micorrización en la variedad Eliana.

No obstante, los valores presentados podrían estar en relación con los niveles de fósforo (P) y materia orgánica (M.O) en el sustrato empleado. En este sentido, Noval (2008), encontró que cuando incrementó los niveles de P en el sustrato disminuyeron los parámetros micorrízicos y viceversa. Al respecto, Wacere y col. (2002) encontraron que en experimentos

donde evaluaron diferentes dosis de P en las variantes donde no aplicaron P, el % de colonización fue mayor, lo que disminuyó con dosis crecientes de este elemento. Por otra parte, inhibiciones en la colonización de las raíces por parte de las micorrizas se han observado en presencia de varios sustratos orgánicos, incluidos la celulosa (Avio y Giovannetti, 1988; Calvet y col., 1992 citados por Gryndler, 2000), componente de la cachaza.

Tabla 3. Parámetros de micorrización por *G. mosseae* en tomate (*S. lycopersicum* var. Eliana).

Tratamientos	Colonización micorrízica (%)	Densidad Visual (%)
Tomate, var. Eliana sin <i>G. mosseae</i> (Control).	20,9 b	0,34 b (1,2)
Tomate, var. Eliana con <i>G. mosseae</i> .	29,0 a	0,58 a (2,1)

Letras desiguales en una misma columna difieren para $p < 0.05$.

La presencia de micorrizas en variantes donde no se inocularon debido a micorrizas nativas en el suelo fue observada también por Gómez y col. (2008) en experimentos en macetas, donde se observó un nivel de micorrizas en el tratamiento testigo, aun cuando el sustrato fue tratado con vapor (esterilizado en autoclave). A pesar de esto, en el tratamiento inoculado se produjo un incremento en el porcentaje de colonización de un 9% y los valores de densidad visual y masa del endófito se duplicaron en ese tratamiento.

Los experimentos de interacciones de nematodos - planta - HMA - ACB que se han desarrollado en Cuba han sido efectuados en condiciones controladas con el empleo de macetas de menor tamaño al empleado en este experimento (Rodríguez y col., 2006; Puertas, 2006; Gómez y col., 2008), donde resultó relativamente fácil poder esterilizar mediante vapor los volúmenes de suelo que emplearon y obtener la completa esterilización del mismo para el montaje de los experimentos.

En este estudio, desarrollado en condiciones de macetas (microplot o microparcela), no fue posible esterilizar el sustrato con el empleo de autoclaves. La evaluación de la desinfección del sustrato fue la primera etapa del trabajo, teniendo en cuenta que no se utilizó el producto que históricamente se había empleado para ello, el Bromuro de Metilo, recomendado por su altísima efectividad en esta labor (Barker, 1985), ya que constituye un producto prohibido en Cuba (Muiño, 2008). Los resultados obtenidos permitieron constatar que el sustrato libre de *Pochonia* spp. y con bajísimas poblaciones de nematodos y HMA estaba listo para el estudio, donde los efectos observados deberán ser atribuidos a los organismos y cepas utilizadas.

- **Comportamiento de los parámetros vegetativos y los rendimientos.**

La mayor masa fresca de raíz se presentó en el tratamiento donde estaban los nematodos solos, seguido del tratamiento donde estaban los nematodos + ACB y el control (Tabla 4). El hecho de que en este tratamiento las plantas presentaran el máximo grado de agallamiento (IA=5), lo que significó que portaban el mayor número de agallas.sistema radical⁻¹, dato que avala este comportamiento. Las raíces agalladas constituyen el reflejo de la existencia de sitios de alimentación para *Meleoidogyne* spp., en los cuales se inducen cambios que constituyen una fuente rica y continuada de alimentos durante toda la vida del nematodo (Gheysen y Jones, 2006 citados por Gómez, 2007). El mecanismo que involucra la formación de estas células genera severos daños a las raíces de las plantas hospedantes (Rodríguez, 2000). Las células gigantes (sitios de alimentación) se forman en número de 2 a 12.nematodo⁻¹, constituyen células de alto metabolismo y se forman por endomitosis sin citoquinesis, el citoplasma se condensa y externamente se observan las agallas, lo que redundo en mayor cantidad de tejido y por tanto mayor masa (peso) (Rodríguez y Gómez, 2008).

Los valores obtenidos en la evaluación de parámetros vegetativos y productivos en la variedad de tomate cuando ésta se desarrolló sola, en presencia de los nematodos y la interacción planta – nematodos - ACB y HMA se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Comportamiento del tomate variedad Eliana en presencia de los nematodos, el ACB y el HMA

Tratamientos		Masa fresca Raíz (g)	Masa seca Raíz (g)	Masa seca de la biomasa aérea (g)	Rendimientos (g / planta)
1	Tomate, var. Eliana (Control absoluto).	51,10 b	20,0 b	60,5 a	2710 ab
2	Tomate con <i>G. mosseae</i> .	47,92 bc	20,4 b	49,0 bc	2328 bc
3	Tomate con <i>M. incognita</i> raza 2.	64,36 a	18,1 bc	42,0 bc	1992 c
4	Tomate con <i>G. mosseae</i> + <i>M. incognita</i> .	45,06 bc	15,3 bc	39,1 c	1984 c
5	Tomate con <i>M. incognita</i> + <i>P. chlamydosporia</i> var. <i>catenulata</i> , cepa IMI SD 187.	63,02 a	27,0 a	56,9 ab	2748 ab
6	Tomate con <i>G. mosseae</i> ; <i>M. incognita</i> + <i>P. chlamydosporia</i> .	42,48 c	13,6 c	45,1 bc	2781 a
ES x ±		3,78	0,69	1,98	99.6

Medias con letras distintas en una misma columna presentan diferencias significativas para p 0.05.

Al respecto, Rumbos y col. (2006) constataron en su experimento que las plantas agalladas presentaron mayor masa fresca de sus raíces que las del control, debido, según estos autores, al severo agallamiento, siendo el IA del tratamiento con *M. incognita* el mayor, con diferencias significativas del resto, tal como se presentó en este estudio.

Por su parte, la menor masa fresca de raíz se presentó en el tratamiento donde estaban juntos el HMA y ACB, en correspondencia con el menor agallamiento de las raíces.

Contrariamente a lo que se presenta con la masa fresca de las raíces, los valores menores de masa seca de raíces y parte aérea se presentaron en los tratamientos donde están los nematodos, en correspondencia con las afectaciones que se atribuyen a la presencia de estos organismos en las plantas, las que incluyen problemas con la absorción de agua y nutrientes y, por tanto, con la reducción de tejidos funcionales, desarrollo foliar entre otros. En este sentido, El-Sherif y col. (2007) informaron que la masa seca de la parte aérea del tomate disminuyó proporcionalmente al aumento de los niveles de *Meloidogyne* en el suelo y que fueron menores que el presentado por los controles sin nematodos.

La mayor masa seca de parte aérea se presentó en el tratamiento sin nematodos en correspondencia con un buen desarrollo de las plantas, sin embargo, los resultados sugieren que la variedad Eliana se comportó como **tolerante** a *M. incognita*, ya que los valores de masa seca y rendimientos se comportaron similares a las plantas sin nematodos (tratamiento control) y en las que tenían nematodos + *P. chlamydosporia* y donde se inocularon los nematodos + *P. chlamydosporia* + *G. mosseae*, lo que sugiere que el ACB podría tener una influencia en el crecimiento y desarrollo de las plantas atacadas, aspecto que debe ser estudiado por las implicaciones prácticas que posee.

En este sentido, se ha informado que la aplicación de *G. fasciculatum* provocó incremento en la altura y masa seca de las plantas inoculadas con *M. incognita* (Asmat y col., 2002). Al respecto, Elsen (2002) informó que la inoculación con *G. mosseae* dio como resultado un mayor crecimiento de las plantas, aún en presencia de *R. similis* y *P. coffeae*. Por su parte, Siddiqui y Akhtar (2007) informaron que *G. mosseae* produjo incremento del crecimiento del tomate y reducción del IA y la multiplicación de *M. incognita*.

Con relación a los rendimientos, los mayores valores se obtuvieron en el control absoluto (variedad) y el tratamiento variedad con nematodos + *G. mossea* + *P. chlamydosporia*. Este fenómeno parece indicativo que la presencia de ambos organismos contribuyó a que la variedad se comportara de forma **tolerante** a los nematodos.

Según Elsen (2002), la aplicación de los HMA podría ser utilizada como una estrategia para disminuir la susceptibilidad a los nematodos, ya que, al parecer, la disminución de la

ramificación en el sistema radical causada por los nematodos es balanceada por el aumento de la ramificación causada por estos hongos.

Al respecto, Fleita (2008) señaló que había comprobado el efecto benéfico (estimulador) de *P. chlamydosporia* sobre el crecimiento y desarrollo del tomate, al inocular el hongo en sustrato inerte (fibra de coco) y desarrollar en este el cultivo. Para corroborar este aspecto se requieren de estudios posteriores, pero la posibilidad de contar con organismos que mejoren la producción de las hortalizas, aún en presencia de poblaciones importantes de nematodos, abre nuevas perspectivas en el uso agrícola de dichos microorganismos.

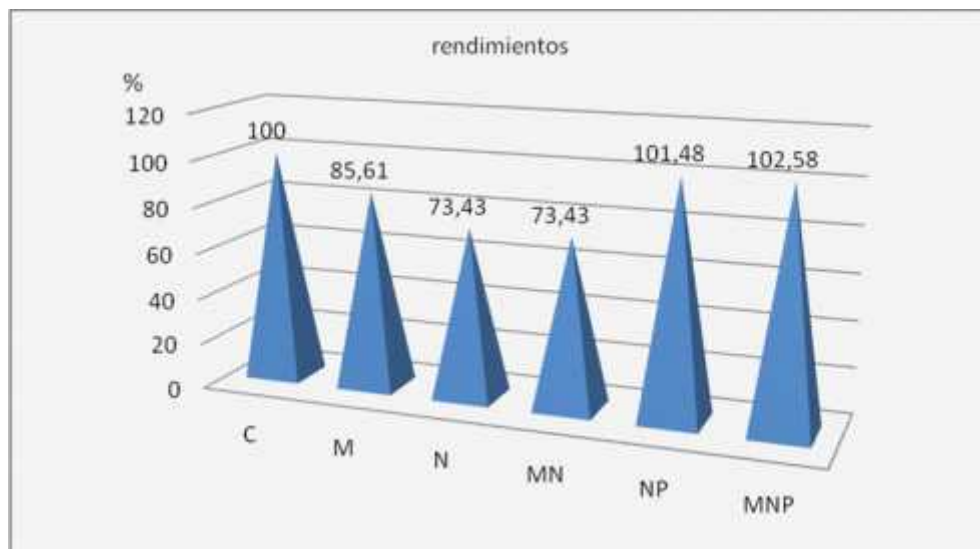


Fig. 19. Influencia sobre los rendimientos del tomate var. Eliana, de la presencia de nematodos, ACB y HMA.

Leyenda: C: control (Tomate var. Eliana); M: *Glomus mosseae*; N: *Meloidogyne incognita* raza 2; P: *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* cepa IMI 187.

Si se toma el rendimiento de la variedad Eliana (sin ningún organismo) y lo expresamos como el 100% potencial de los rendimientos, se logra establecer que las mayores reducciones de este parámetro se obtuvieron en los tratamientos con nematodos sin la presencia del ACB. (Fig. 19). Por otra parte, se produjeron mayores rendimientos en los tratamientos donde *P. chlamydosporium* se encontraba presente (solo o junto a *G. mosseae*) con incremento entre 1 y 2 % por encima del obtenido en las plantas control sin inocular.

Con relación a este fenómeno, Schwob y col. (1999) señalaron que el efecto de los HMA sobre el ciclo de los nematodos no es curativo, pues los nematodos se desarrollan y completan sus ciclos de vida, sin embargo, la presencia de estos organismos compensa el daño causado por estos invertebrados a las plantas.

- **Contenido foliar de N, P y K.**

El creciente interés, con respecto a la utilización de los HMA como Biofertilizantes, viene dado fundamentalmente, por la capacidad de las hifas externas de las raíces colonizadas para absorber nutrientes del suelo y traslocarlos con mayor eficiencia a la biomasa aérea de las plantas, lo que promueve un mayor desarrollo de estos y permite disminuir las dosis de fertilizantes minerales a aplicar. Al respecto, el efecto nutricional más notorio, y también el más estudiado, es el aumento en la absorción de fósforo, factor que limita el crecimiento vegetal en la mayoría de los suelos, sin embargo, poco se habla del efecto de la micorrización sobre la absorción de los otros dos macro-elementos (N y K), los que constituyen factores limitantes de la producción en algunos suelos tropicales (Llonín, 1999).

En nuestro estudio, se puso de manifiesto que la micorrización tuvo mayor influencia en la absorción de nitrógeno, que de fósforo y potasio (Tabla 5), donde se aprecia que en el tratamiento de Tomate + *G. mosseae* + *M. incognita*, estas contribuyeron a la absorción del nitrógeno, siendo mayor con respecto al tratamiento donde se encontraba Tomate + *M. incognita* raza 2 solos. Por su parte, con relación al fósforo y al potasio, las micorrizas no contribuyeron a una buena absorción del mismo, porque se observa que no hubo diferencia significativa entre tratamientos para estos elementos, pudiendo estar dado por los altos contenidos de nutrientes que contenía el sustrato.

Este fenómeno, pudiera también estar relacionado con los porcentajes de micorrización, resultando necesario ejecutar estudios posteriores para determinar el por qué de dicho comportamiento.

Tabla 5. Contenidos de nutrientes en la biomasa aérea en el tomate, al final del ciclo.

Tratamientos		N g.planta ⁻¹	P g.planta ⁻¹	K g.planta ⁻¹
1	Tomate, var. Eliana (Control absoluto).	2.23 ab	0.13 a	1.57 a
2	Tomate con <i>G. mosseae</i> .	2.55 a	0.13 a	1.41 ab
3	Tomate con <i>M. incognita</i> raza 2.	0.96 d	0.10 a	1.03 b
4	Tomate con <i>G. mosseae</i> + <i>M. incognita</i> .	1.69 bc	0.10 a	1.11 ab
5	Tomate con <i>M. incognita</i> + <i>P. chlamydosporia</i> var. <i>catenulata</i> , cepa IMI SD 187.	1.47 cd	0.14 a	1.32 ab
6	Tomate con <i>G. mosseae</i> ; <i>M. incognita</i> + <i>P. chlamydosporia</i> .	2.68 a	0.11 a	1.35 ab
ES x ±		0.158	0.005	0.063

Medias con letras distintas en la misma columna presentan diferencias significativas para p 0.05.

Es de destacar que en el tratamiento donde interactuaban Tomate con *G. mosseae*; *M. incognita* + *P. chlamydosporia*, donde hubo menor masa seca, como se puede apreciar en la tabla 4, y una mayor e igual extracción de nitrógeno, fósforo y potasio, como también se observa en la tabla 5, con respecto al tratamiento control absoluto, se obtuvo igual rendimiento en g.planta⁻¹.

En este estudio *G. mosseae*, funcionó adecuadamente con relación a su papel en la nutrición de la variedad Eliana, pues aun cuando no hubo respuesta a la absorción de fósforo y potasio en los tratamientos donde se encontraba el HMA, se produjeron incrementos en la absorción de nitrógeno.

4.3. DISCUSIÓN GENERAL

Los nematodos formadores de agallas (*Meloidogyne* spp.) constituyen importantes plagas del tomate en las diferentes tecnologías de producción, por lo que en el mundo se ha trabajado para la obtención de variedades con resistencia a esta plaga, de modo de ser incorporadas en los sistemas productivos.

Numerosas variedades son hoy portadoras de genes (*Mi* y otros) que confieren a las mismas, resistencia a poblaciones de *M. incognita*, *M. arenaria* y otras especies, constituyendo la principal limitante para su uso generalizado, el hecho de que el gen *Mi* se inactiva cuando las temperaturas exceden los 28°C, hecho común en la primavera-verano de los países de la zona tropical como Cuba, y que en la actualidad, son temperaturas que se presentan de forma frecuente en las temporadas invernales de esta zona, debido al fenómeno del calentamiento global y los cambios climáticos que se operan a nivel planetario.

Por esta razón y porque se conoce que la resistencia se puede quebrantar también por altas presiones de inóculo de nematodos en el suelo, se recomienda el uso de Programas de Manejo Integrado (MIP) que involucren organismo benéficos como los HMA y los ACB, la resistencia varietal y otras tácticas.

Se conoce que la micorrización y la efectividad de los ACB, ofrecen diferentes respuestas en dependencia de la especie/variedad de planta, aislado de micorriza y población de nematodo (Trivedi, 1998; Luc y col., 2005) y ACB (Oyekanmi y col., 2007), por lo que resultó necesario llevar a cabo este estudio con la nueva variedad de tomate (*S. lycopersicum* L.) Eliana, obtenida por el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.

Los resultados alcanzados en este trabajo, pusieron de manifiesto que la variedad de tomate Eliana, a la que se había incorporado el gen *Mi*, perdió la resistencia a *M. incognita* raza 2 debido, probablemente, a las altas temperaturas imperantes en el invierno 2006 - 2007, y como resultado de la presencia de *G. mosseae* y *P. chlamydosporia* var *catenulata*, los que produjeron una disminución de más de un 50% en el IA, la variedad exhibió rendimientos adecuados en las plantas con nematodos, en comparación con el potencial de la variedad.

Al respecto, autores como Rao y col. (2000) han señalado que el uso de HMA y ACB como *Glomus* sp. y *Pasteuria penetrans* han provocado la disminución de los IA y el incremento de los parámetros vegetativos y productivos de hortalizas en los tratamientos con nematodos y estos otros organismos. Mientras que, Oyekanmi y col. (2007) señalaron que el uso de organismos como *Bradyrhizobium japonicum*, *Trichoderma pseudokoningii* y *G. mosseae* no produjeron una sustancial disminución de *M. incognita* en dos cultivares de soya, lo que pone de manifiesto la existencia de respuestas diferenciales en cada interacción y que

refuerza la necesidad del desarrollo de este tipo de investigación en variedades que no habían sido estudiadas previamente.

En este contexto, los resultados alcanzados demuestran que para que *G. mosseae* no interfiera en la acción colonizadora de las raíces de *P. chlamydosporia* var. *catenulata*, resulta necesario aplicar este último organismo al suelo o sustrato que se emplea en la producción de las plántulas, de manera que ambos organismos lleguen con cierto sincronismo a la zona de la rizosfera y colonicen de forma conjunta dicha zona.

Los resultados de este experimento indican un efecto supresor de *G. mosseae* sobre el nematodo *M. incognita* en las raíces, lo que se expresó en la disminución de un 20% en el IA, en comparación con el tratamiento con nematodos solos y que podría estar relacionado con cambios bioquímicos y/o anatómicos o morfológicos en los tejidos de las plantas, u otra causa, aspectos que deben ser estudiados en investigaciones que desarrolle el equipo CENSA - INCA en un futuro, de manera de dilucidar los mecanismos involucrados en esta interacción. Al respecto, señalaron Kesba y Al-Sayed (2005) que los factores asociados con el tipo de hospedante, parásito y organismos (simbiontes y otros), los que añaden complejidad a este tipo de investigación, deben ser estudiados para ser explotados convenientemente en el manejo de las plagas.

Estudios posteriores serán necesarios para continuar profundizando en esta interesante interacción, ya que se sabe que una clave para el progreso en el campo del control biológico es lograr el entendimiento de la dinámica de la interacción entre los agentes biológicos (biorreguladores y otros organismos benéficos) y las plagas en la rizosfera, de cómo las poblaciones de unos y otros grupos interactúan y la influencia que reciben del ambiente físico (Paulitz, 2000).

Se conoce que los HMA desempeñan un importante papel en la nutrición de los cultivos, pero que, los cultivos tratados con estos organismos ofrecen diferentes respuestas en su interacción con las poblaciones de nematodos debido a la especificidad de las interacciones especie/variedad de planta - aislado de micorriza - población de nematodo (Trivedi, 1998; Luc y col., 2005), donde se ha informado que la micorrización puede ser afectada por la presencia de nematodos en las raíces (Estañol y col., 1999), así como el número de esporas de los HMA en el suelo (Kesba y Al-Sayed, 2005) y que se producen interacciones antagónicas entre HMA y agentes de control biológico (Oyekanmi y col., 2007).

Las complejas interacciones fisiológicas entre microorganismos hacen difícil formular "bases" precisas acerca de los diversos tratamientos para el control de nematodos. Los factores asociados con el tipo de hospedante, parásitos y organismos simbióticos añaden también complejidad a las interacciones (Kesba y Al-Sayed, 2005).

El estudio representa un acercamiento a la compleja interacción planta - nematodo - micorriza - *Pochonia*, demostrándose que con la presencia de los HMA y el ACB se logra una disminución significativa en el índice de agallamiento del cultivo del tomate, var. Eliana y una disminución en el número de ootecas.g⁻¹ y de huevos.ooteca⁻¹ lo que representa una menor población de *M. incognita*, que sin duda está relacionado con el aumento de los rendimientos en aquel tratamiento donde interactúan ambos microorganismo. Los mecanismos implicados en estos resultados, deben ser sin embargo, objeto de estudios posteriores.

5. CONCLUSIONES

1. Se demostró la pérdida de resistencia en la variedad Eliana en las condiciones en que se desarrolló este estudio, donde los niveles de producción de huevos de *M. incognita*, se encontraron dentro de los rangos normales exhibidos por esta especie de nematodo en variedades susceptibles.
2. El hongo micorrízico arbuscular *Glomus mosseae*, inoculado al sustrato antes que el ACB, limitó el desarrollo de *Pochonia chlamydosporia* y su efectividad en las raíces, al disminuir su actividad parasítica.
3. Se pudo comprobar que la variedad Eliana, aun cuando tuvo afectación de sus parámetros vegetativos y productivos en presencia de *M. incognita*, mostró un comportamiento tolerante al nematodo, en los tratamientos donde *G. mosseae* y *P. chlamydosporia* estaban presentes, obteniendo valores de rendimientos similares al tratamiento control.
4. La presencia del HMA y el ACB, provocaron la disminución del número de ootecas de *M. incognita*, mientras que el menor número de huevos por ooteca se presentó en las plantas tratadas con *P. chlamydosporia* solo, lo que evidencia el potencial de estos microorganismos para el manejo progresivo de las poblaciones de nematodos en el tiempo.

6. RECOMENDACIONES

- En la producción de plántulas, la inoculación de *P. chlamydosporia* debe efectuarse en el momento de la preparación del sustrato junto con el HMA, para propiciar la adecuada colonización de ambos, disminuyendo así el efecto negativo mostrado por *G. mosseae* sobre el desempeño del ACB.
- Realizar la evaluación de la variedad Eliana ante *M. incognita* raza 2 bajo nuevas condiciones ambientales.
- Continuar profundizando en el estudio de la interacción hospedante - *G. mosseae* - *M. incognita* - *P. chlamydosporia* desde el punto de vista bioquímico y molecular, que permita dilucidar los mecanismos involucrados en dicha interacción.

7. REFERENCIAS

1. Abad, P.; Favery, B.; Rosso, M. and Castagnone-Sereno, P.: Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction. *Molecular Plant Pathology*, 4(4): 217-224, 2003.
2. Agrobit (2003): Guía técnica del cultivo del tomate. (Consultado 18/3/2005). Disponible en: <<http://www.agrobit.com.ar/info-tecnica/Alternativos/orticultura/AL000014ho.htm>>.
3. Almeida-Engler, J.; de Vleeschauwer, V.; Burssens, S.; Celenza, J.; Inzé, D.; van Montagu, M.; Engler, G. and Gheysen, G.: "Molecular Markers and Cell Cycle Inhibitors Show the Importance of Cell Cycle Progression in Nematode-Induced Galls and Syncytia". *The Plant Cell*, 11: 793–807, 1999.
4. Álvarez, M; Lara R. M; Rodríguez J; Fernández-Muñoz R; Cuartero J. (2004). Eliana. *Tomato Genetics Cooperative* 54: 46.
5. Álvarez, M; Lara R. M; Rodríguez J; Fernández-Muñoz R; Cuartero J. (2006): Incorporación del Gen *Mi* a variedades de tomate mediante el marcador *Aps-1*. *Cultivos Tropicales* 27(3): 69-73.
6. Álvarez, Marta. , Georgina de Armas y B. Martínez. (1997): Amalia y Mariela, dos nuevas variedades de tomate para consumo fresco. *Cultivos Tropicales* 18 (1): 83.
7. Asmat, S.; I. Mahmood, Z. A. Siddiqui. (2002): Integrated management of root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on chickpea. *Thai Jour. Agricultural Science* 35(3): 273-280.
8. Ateka, E. M.; A.W. Mwang'Ombe; J.W. Kimenju. Studies on the interaction between *Ralstonia solanacearum* (Smith) and *Meloidogyne* spp. in potato. *African Crop Science Journal*, 9 (3): 527-535, 2001.
9. Atkins, S. D.; Hidalgo-Díaz, L.; Clark, I. M.; Morton, C. O.; Montes de Oca, N.; Gray, P. A. y Kerry, B. R.: "Approaches for monitoring the release of *P. chlamydosporia* var. *catenulata*, a biological control agent of root-knot nematodes". *Mycol. Res.*, 107(2): 206-212, 2003.
10. Atkins, S. D.; Hidalgo-Díaz, L.; Kalisz, H.; Mauchline, T. H.; Hirsch, P. R. and Kerry, B. R.: "Development of a new management strategy for the control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in organic vegetable production". *Pest Management Science*, 59: 183-189, 2002.
11. Azcón, C. y Barea, J. Papel de los hongos Micorrízicos en la estabilidad y productividad de sistemas suelo-planta sostenible. Departamento de

- Microbiología del suelo y sistemas simbióticos. Estación experimental del Zaidin. España. 2001.
12. Azcón-Aguilar, C. and Barea, J.M. 1991. Interactions between mycorrhizal fungi and other rhizosphere microorganisms. En: Mycorrhizal functioning. An integrative plant- fungal process. Chapman y Hall, New York.
 13. Azcón-Aguilar, C., A. Barceló, MT. Vidal and G. de la Viña: Further studies on the influence of mycorrhizae on growth and development of micropropagated avocado plants. *Agronomie* 12, 837-840 (1992).
 14. Bagyaraj, D. J.; A. Manjunath; D. D. R. Reddy (1979): Interaction of vesicular arbuscular mycorrhiza with root-knot nematodes in tomato. *Plant Soil* 51. 397-403.
 15. Baker, K. F. (1974): *Biological Control of Plant Pathogens*. Freeman & Co., San Francisco.
 16. Barea J.M.; Azcon, C.; Aguilar, J. A.; Ocampo. R.: Morfología, anatomía y citología de los MVA. Fijación biológica de nutrientes. Madrid: CSIC, 1991.173 p.
 17. Barea, J. M. & P. Jeffries. Arbuscular Mycorrhizas in Sustainable Soil-Plant Systems. Mycorrhiza. Springer-verlang. Berlín Heidelberg. 1993. p. 521-560.
 18. Barea, J. M. & P. Jeffries. Arbuscular Mycorrhizas in Sustainable Soil-Plant Systems. Mycorrhiza. Springer-verlang. Berlín Heidelberg. 1995. p. 521-560.
 19. Barker, K. R. (1985): The application of microplot techniques in Nematology Research. Pp. 127 -134 En *an Advanced Treatise on Meloidogyne*. Vol. II: Methodology. K. R. Barker; C.C. Carter; J. N. Sasser (Eds.). Dept. Plant Pathology and United State Agency for International Development. North Carolina State University.
 20. Barker, K. R.: "Perspectives on Plant and Soil Nematology". *Annu. Rev. Phytopathol.*, 41: 1-25, 2003.
 21. Barron, G. L. and Onions, Agnes H. N. (1966): *Verticillium chlamydosporium* and its relationships to *Diheterospora*, *Stemphyliopsis*, and *Paecilomyces*. *Canadian Journal of Botany* 44: 861-869.
 22. Batista, A. C. e Fonseca, O. M. (1965): *Pochonia humicola* n. gen. e. n. sp. una curiosa entidade fungicola dos solos do Nordeste do Brasil. *Inst. Micol. Univ. Recife Publ.* 462.
 23. Bello, A.; J. A. González; María Arias; R. Rodríguez-Kabana (Eds.) (1997): Alternatives to Methyl Bromide for the Southern European Countries. Gráficas Papallona S. C. V., Spain. 404pp.

24. Bello, A.; López-Pérez, J. A.; Díaz-Viruliche, L. and Tello, J.: Alternatives to methyl bromide for soil fumigation in Spain. En: *Global Report on Validated Alternatives to the Use of Methyl Bromide for Soil Fumigation* (Labrada, R. y Fornasari, L. Eds). FAO-UNEP. Chapter III: 31-42, 2001.
25. Berkelaar, E.: Métodos de Manejo de Nematodos. *ECHO Notas de Desarrollo*, 75: 1-6, 2002.
26. Bethelenfalvay, G. J.; Mycorrhizae in the agricultural plant-soil system. *Symbiosis*. 1992. 14: 413-425.
27. Bilgrami, A. L. (2008): Biological control potentials of predatory nematodes. Pp. 3 -28. En *Integrated Management and Biocontrol of Vegetable and Grain Crops Nematodes*. A. Ciancio y K. G. Mukerji (eds.). Springer.
28. Bourne, J. M. and Kerry, B. R.: Effect of the host plant on the efficacy of *Verticillium chlamydosporium* as a biological control agent of root-knot nematodes at different nematodes densities and fungal application rates. *Soil Biol. Biochem.*, 31(1): 75-84, 1999.
29. Bourne, J. M.: Making a soil suppressive to root-knot nematodes by applications of *Verticillium chlamydosporium*. En: *Tri-tropic Interactions in the Rhizosphere*. IOBC/WPRS Bulletin, 24 (1): 25-30, 2001.
30. Bourne, J. M.; Kerry, B. R. and de Leij, F. A. A. M.: The importance of the host plant on the interaction between root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and the nematophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium* (Goddard). *Biocontrol Sci. and Technol.*, 6: 539-548, 1996.
31. Bourne, J.M. and Kerry, B.R.: Observations on the survival and competitive ability of the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* in soil. *International Journal of Nematology* 10:9-18, 2000.
32. Braga, R.; Labrada, R.; Fornasari, L. y Fratini, N.: Manual para la Capacitación de Trabajadores de Extensión y Agricultores - Alternativas al Bromuro de Metilo para la Fumigación de los Suelos. Unidad de Acción para el Ozono y la Energía, PNUMA-FAO, Roma, 74 p., 2003.
33. Brown, R. H. and Kerry, B. R.: Principles and Practice of Nematode Control in Crops. Academic Press Australia, 1987p.447.
34. Campos, H. D. e Campos, V. P.: Efeito do tipo de materia organica e da epoca e forma de aplicacao dos fungos *Arthrobotrys conoides*, *Arthrobotrys musiformis*, *Paecilomyces lilacinus* e *Verticillium chlamydosporium* no controle de *Meloidogyne incognita* raca 2 no feijoeiro. *Summa Phytopathologica*, 22 (2): 168 -171.1996.

35. Cannayane, I. and Rajendran, G.: Application of biocontrol agents and oil cakes for the Management of *Meloidogyne incognita* in Brinjal (*Solanum melongena* L.). *Current Nematology*, 12 (1/2): 51-55, 2001.
36. Caron, M. (1989): Potential use of mycorrhizae in control of soil-borne diseases. *Canadian Jour. Plant Pathol.* 11: 177 - 179.
37. Casanova, A., Olimpia Gómez y T. Depestre. Evaluación del efecto de motas prensadas en el trasplante del tomate. *Agrotecnia de Cuba* 23 (1-2): 5-8, 1991.
38. Casanova, A.; Gómez, Olimpia; Pupo, F. R.; Hernández, M.; Chailloux, Maritza; Depestre, T.; Pupo, F. R. (2003): Manual para la producción Protegida de Hortalizas. MINAG-Viceministerio de Cultivos Varios-IIHLD, La Habana, Cuba. 113pp.
39. Castillo, P.; J. A. Navas-Cortés; D. Gomar-Tinoco; M. Di Vito; R. M. Jiménez-Díaz. Interactions Between *Meloidogyne artiellia*, the Cereal and Legume Root-Knot Nematode, and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* Race 5 in Chickpea. *PHYTOPATHOLOGY* 93 (12), 1513 - 1523, 2003.
40. Castillo, A. M.: "Biología y control fitotécnico de *Meloidogyne incognita* en el pimiento en la provincia Granma". Tesis para optar por el grado a Doctor en Ciencias Agrícolas. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, La Habana, 120 p., 1988.
41. Castillo, P.; Nico, A. I.; Azcón-Aguilar, C.; Del Río Rincón, C.; Calvet, C.; Jiménez-Díaz, R. M. (2006): Protection of olive planting stocks against parasitism of root-knot nematodes by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Pathology* 55 (5): 705-713.
42. Causse, M.; Lecmte, L.; Baffert, N. Ouffe, P.; Hospital, F. (2000): Marker – Assisted Selection for the transfer of QTLs controlling fruit quality traits into tomato Elite lines. ISHS. Acta Horticulturae 546: International Symposium on Molecular Markers for characterizing genotypes and Identifying Cultivars in Horticulture.
43. Ciancio, A.; Carbonell, E. y Crozzoli, R. Ecología y biodiversidad de *Pasteuria* spp., antagonistas naturales de nematodos fitoparasíticos. *Fitopatología Venezolana*, 11(1): 1-9, 1999.
44. Cook, R.; J. L. Starr. (2006): Resistant Cultivars. Pp 370-391 En *Plant Nematology*. R. N. Perry and M. Moens (Eds). CABI.
45. Cuadra, R. y Bernal, B.: Lucha contra plagas y enfermedades. Alternativas apropiadas de la Agricultura Urbana. En: *Curso de Agricultura Urbana*, p.

- 121-139. Agencia española de Cooperación Internacional-INIFAT. La Habana, 1997.
46. Cuadra, R.; Cruz, X. and Fajardo, J. L.: The use of short cycle crops as trap crops for the control of root-knot nematodes. *Nematropica*, 30: 241-246, 2000.
47. Cuadra, R.; Cruz, Xiomara; Zayas, M. y González, N.: (2002): Incidencia de plagas en policultivos de organopónicos. II. Nematodos fitoparásitos. *Rev. Protección Veg.*, 17(1): 54-58.
48. Cuadra, R.; Xiomara Cruz; J. L. Fajardo; J. Ortega; E. Fernández, Mayra G. Rodríguez, M. Sio Wongn; A. García. (2005): Los cultivos de ciclo corto como plantas extractora de nematodos de las agallas en un sistema de manejo integrado. Ponencia Forum Municipal de Ciencia y Técnica, Boyeros. Ciudad Habana. 15pp (INIFAT- Documento inédito)
49. Cuadra, R.; Xiomara Cruz; Ortega, J.; Shagarodsky, T y Maribel González. (2005): Respuesta de *Lycopersicon* ssp. Frente al ataque del nematodo de las agallas (*Meloidogyne incognita*). *Rev. Protección Veg.* 20 (2): 114-121.
50. D'Addabbo, T.: The nematicidal effect of organic amendments: A review of the literature, 1982-1994. *Nematol. Medit.*, 23: 299-305, 1995.
51. Daniels, B. A and Trappe J. M. Factors affecting spore germination of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus espigaeus*. *Mycologia*. 1980, vol 72, p. 457-471.
52. Darwin, S.C.; Knapp, S.; Peralta, I.E. (2003). Taxonomy of tomatoes in the Galápagos Islands: native and introduced species of *Solanum* section *Lycopersicon* (Solanaceae). [Systematics and Biodiversity](#). 1: 29-5.
53. Davies, K. G.; de Leij, F. A. A. M. and Kerry, B. R.: Microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes in tropical agriculture. *Tropical Pest Management*, 37(4): 303-320, 1991.
54. De Leij, F. A. A. M. and Kerry, B. R.: The nematophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium*, as a potential biological control agent for *Meloidogyne arenaria*. *Révue de Nématologie*, 14: 157-164, 1991.
55. De Ley, P. and Blaxter, M. L. (2002): Systematic position and phylogeny. En: *The biology of Nematodos*. Lee, D. L. (Ed.) Taylor y Francis, London, 1-30pp
56. Decraemer, W. and Hunt, D.: Taxonomy and Principal Genera. Structure and classification. En: *Plant Nematology* (Perry, R. y Moens, M. Eds). CAB International, Wallingford, UK. Part I, Chapter 1: 3-32, 2006.
57. Díaz-Viruliche, L.: Interés fitotécnico de la biofumigación en los suelos cultivados“. Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas.

- Universidad Politécnica de Madrid, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, 591 p., 2000.
58. Díaz-Viruliche; Luisa; I. Castro; Mayra G. Rodríguez y Lucila Gómez. (2004): La Biofumigación en el Control de Fitonematodos. En *Memorias Congreso Latinoamericano de Bioplaguicidas y Abonos Orgánicos*. 16 al 20 de Octubre, San José, Costa Rica. CD editado por CANIAN – GTZ – CATIE.
 59. Dominik, T. and Majchrowick, I. (1966): Some new species of fungi from the soil of Conakry. *Mycopathol. Mycol. Appl.* 28:209-219.
 60. Edongali, E. A. and Ferris, H.: Varietal response of tomato to the interaction of salinity and *Meloidogyne incognita* infection. *J. Nematol*, 14: 57-62, 1982.
 61. Ehteshamul, H. S.; Abid, M.; Sultana, V.; Ara, J. and Ghaffar, A.: Use of organic amendments on the efficacy of biological agents in the control of root rot and root-knot disease complex of okra. *Nematol. Medit.*, 24(1): 13-16, 1996a.
 62. Ehteshamul, H. S.; Abid, M.; Sultana, V.; Ara, J. and Ghaffar, A.: Use of *Prosopis* spp., in the control of root-knot disease of okra. *Pakistan Journal of Nematology*, 14(2): 101-106, 1996b.
 63. Elsen A.; S. Declerck; D. De Waele (2002): Efecto de tres hongos micorriza arbusculares sobre la infección de *Musa* con el nematodo nodulador de las raíces (*Meloidogyne* spp.). *INFOMUSA* 11 (1): 21-23.
 64. Elsen, Annemie (2002): Estudio de la interacción entre los hongos micorriza arbusculares y nematodos fitoparásitos en *Musa* spp. *INFOMUSA* 11 (1): 55.
 65. El-Sherif; A. G.; A. R. Refaei; M. E. El-Nagar; Hagar M. M. Salem (2007): The role of eggs inoculum level of *Meloidogyne incognita* on their reproduction and host reaction. *African Jour. Agricultural Research* 2(4): 159-163.
 66. Estañol, Elizabeth; R. Ferrera; C. Sosa- Moss; J. A. Santizo; R. Quintero. (1999): Interacción del nematodo *Meloidogyne chitwoodi* con tres especies de hongo *Glomus* sp. en la producción y distribución de materia seca de plantas jóvenes de maíz. *TERRA* 17 (1): 17-25.
 67. FAO. 1999. Base Referencial Mundial del Recurso Suelo. Informe sobre recursos mundiales de suelos. Sociedad Internacional de las Ciencias del Suelo (SICS), Centro Internacional de Referencia e Información en Suelos (ISRIC) y FAO. 90 p.
 68. FAO.1999. Anuario de producción 1995.Roma.
 69. FAOSTAT 2006. Datos provisionales 2005 de producción, última actualización Febrero, 2006 disponible en: www.faostat.fao.org/faostat. (Fecha de consulta Abril 18, 2006).

70. Fenoll, C. and Del Campo, F. F. The molecular basis of nematode endoparasitism in plants. *Physiology Molecular Biology Plants*, 4: 9-18, 1998.
71. Fernández, A.; Peteira, B.; Gonzáles, M.C.; LLanes, L.Y. (2003) Caracterización de somaclones y mutantes de arroz mediante el uso de marcadores isoenzimáticos. *Revista Protección Vegetal*. Vol18, no 3: 189 - 195.
72. Fernández, E.; Lovaina, A. and Cuadra, R.: Pest management in Urban Agricultura Systems: A case study with plant-parasitic nematodes. En: *XXXVI Annual Meeting of ONTA*, p. 58. Puerto Vallarta, México, October 4-8, 2004.
73. Fernández, E.; Pérez, M.; Gandarilla, H.; Vázquez, R.; Fernández, M.; Peneque, M.; Acosta, O.; Basterrechea, M. y Cuadra, R.: "Guía para disminuir infestaciones de *Meloidogyne* spp. mediante el empleo de cultivos no susceptibles". *Boletín Técnico, Sanidad Vegetal*, 4(4): 1-18, 1998.
74. Fernández, E; Pérez, M.; Gandarilla, H.; Vázquez, R.; Fernández, M.; Peneque, M.; Acosta, O. y Basterrechea, M.: Rango de hospedantes de *Meloidogyne* spp. dentro de los cultivos económicos. En: *IV Seminario Científico de Sanidad Vegetal*, p. 31. Varadero, Cuba, junio, 2001.
75. Fernández, F., Dell'Amico, J. M. y Rodríguez, P.: Efectividad de algunos tipos de inoculantes micorrízicos a base de *Glomus hoi* "like" en el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. Var. Amalia). *Cultivos Tropicales*, 2006, vol. 27, no. 3, p. 25-30.
76. Fernández, F.: Manejo de las asociaciones micorrízicas arbusculares sobre la producción de posturas de cafeto (C. arábica L. var. Catuai) en algunos tipos de suelos. /F. Fernández. Tesis de grado (Dr. En Ciencias Agrícolas), INCA, 102 p. 1999.
77. Fernández, F.; Vanega, L.F.; De la Noval, B.; Rivera, R.: Producto Inoculante Micorrizógeno. Certificado de autor de Invención. Oficina Nacional de la Propiedad Industrial. Patente No. 22 641. La Habana, 2000.
78. Fernández, M. y Ortega, J.: An overview of nematological problems in Cuba. *Nematropica*, 28: 151-164, 1998.
79. Fernández-Larrea, O.: Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado de Plagas*, (62): 96-100, 2001.
80. Fernández-Larrea, O.: Tecnologías de producción de *Bacillus thuringiensis*. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, (64): 110-115, 2002.
81. Fleita, Leandro. (2008) Profesor Universidad Vizousa, Brasil. Visita técnica al CENSA. Conferencia acerca de los resultados de su equipo de investigación, (inédito) (comunicación Personal).

82. Furlan, V and Fortin, J.A. Effects of light intensity in formation of vesicular-arbuscular mycorrhizae on *Allium cepa* by *Gigaspora calospora*. *New Phytol.* 1997, 79, p- 335-340.
83. Gams, W. and Zare, R.: A revision of *Verticillium* section Prostrata. III. Generic classification. *Nova Hedwigia*, 73(3-4): 329-337, 2001.
84. Gams, W.: A contribution to the knowledge of nematophagous species of *Verticillium*. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 94:123-148, 1988.
85. Gandarilla, H.: Algunos aspectos sobre las principales especies de fitonematodos asociadas a los cultivos de plantas ornamentales. *Fitosanidad*, 9(2): 49-57, 2005.
86. Gerdemann, J.W. and Nicholson, T.H. Spore of mycorrhizae endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 1963, p.235-244.
87. Gianinazzi, S.; Trouvelot, A.: Gianinazzi-Pearson, V.: Role and use of micorrizas in horticultural crop production. *Advances in Horticultural Science*, 1991, vol 4, p. 25-30.
88. Gianinazzi-Pearson, V. y C. Azcón-Aguilar. Fisiología de las Micorrizas vesículo-arbusculares. Fijación y Movilización Biológica de Nutrientes. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid. 1991. Vol. II. p. 175-192.
89. Giovannetti, M. y Mosse, B.: An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol*, 84: 489-500, 1980.
90. Goddard, H. N.: Can fungi living in agricultural soil assimilate free nitrogen. *Bot. Gaz.*, 56: 249-305, 1913.
91. Gómez, L. G.: Diagnóstico de nematodos agalleros y prácticas agronómicas para el Manejo de *Meloidogyne incognita* en la Producción Protegida de Hortalizas. Tesis en opción al grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. 2007. p200. Cuba.
92. Gómez, L.; Sánchez, L.; Baró, G.; Rodríguez, M. y Hidalgo, L.: Virulencia de aislamientos cubanos de *Arthrobotrys oligospora* frente a *Meloidogyne incognita*. *Rev. Protección Veg.*, 18(2): 141-143, 2003.
93. Gómez, Lucila y Mayra G. Rodríguez (2005): Evaluación de un sistema de rotación de cultivos para el manejo de *Meloidogyne* spp. en sistemas de cultivos protegidos. *Rev. Protección Veg.* 20(1): 67-69.

94. Gómez, Olimpia; Casanova, A.; Laterrot, H.; Anais, G. (2000): Mejora genética y manejo del cultivo del tomate para la producción en el Caribe. IIHLD" Liliana Dimitrova". MINAGRI. La Habana, Cuba. 159 pp.
95. Gowen, S.; K. G. Davies; B. Pembroke. (2008): Potential use of *Pausteria* spp. in the management of plant parasitic nematodes. Pp. 2005 -219. En *Integrated Management and Biocontrol of Vegetable and Grain Crops Nematodes*. A. Ciancio & K. G. Mukerji (eds.). Springer.
96. Gryndler, M. (2000): Interaction of arbuscular mycorrhizal fungi with other soil organisms. Pp. 239-262. En *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and function*. Y. Kapulnik and D. D. Douds, Jr. (Eds.). Kluwer Academic Publisher. Netherlands.
97. Gullino, M. y Benuzzi, M.: Mezzi biologici e prodotti di origine naturale per la difesa dai parassiti terricoli. *Informatore Fitopatologico*, 10: 51-57, 2003.
98. Harrier, Lucy A.; Christine A. Watson (2004): The potential role of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi in the bioprotection of plants against soil-borne pathogens in organic and/or other sustainable farming systems. *Pest Manag Sci* 60:149–157.
99. Hartman, K. M. and J. N. Sasser. 1985: Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perennial pattern morphology. Pp. 69-77. *An Advanced treatise on Meloidogyne. Vol. II Methodology*. K. R. Barker; C. C. Carter; J. N. Sasser (Eds.). Dept. Plant Pathology and United State Agency for International Development. North Carolina State University Graphics.
100. Hayman, D.S. Plant growth responses to vesicular- arbuscular mycorrhizae. Effects of light and temperature. *New Phyt.* 1974, 73, 71-80.
101. Hernández, A., Pérez, J., Bosch., D. y Rivero, L.D. 1999. Nueva Versión de Clasificación Genética de los Suelos de Cuba. Inst. Suelos, La Habana.
102. Hernández, A.; Ascanio, M. O.; Morales, M and Goatherd, A. Correlation of the new version of international classification of the floors of Cuba with the international and national classifications: A tool for the investigation, docencia and agricultural production. Havana. National institute of Agricultural Sciences (INCA). 2005. p 60.
103. Hernández, M.I.; Chailloux, M. (2004). Las micorrizas arbusculares y las bacteria rizoféricas como alternativa a la nutrición mineral del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Cultivos Tropicales*, 25(2):5-12.
104. Herrera, R.A.: Estrategia de funcionamiento de las micorrizas VA en un bosque tropical. *Biodiversidad en Iberoamérica: Ecosistemas, Evolución y Procesos*

- Sociales. En: Programa Iberoamericano de Ciencias y Tecnologías para el desarrollo. Subprograma XII, Diversidad Biológica, Mérida, 1995.
105. Hidalgo –Díaz, L.; B. R. Kerry (2008): Integration of Biological Control with other methods of nematode management. Pp. 29-49. En *Integrated Management and Biocontrol of Vegetable and Grain Crops Nematodes*. A. Ciancio & K. G. Mukerji (Eds.). Springer.
 106. Hidalgo, L.; Sánchez, Lourdes y Rodríguez, Mayra G.: Evolución de la agricultura en Cuba. Desarrollo actual y perspectiva. Conferencia presentada en el Ayuntamiento Arona, Tenerife, 12 de junio del 2002.
 107. Hidalgo-Díaz, L.: Potencialidades de cepas autóctonas de *Verticillium chlamydosporium* (Goddard) como agente de control biológico de *Meloidogyne* spp. Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. UNAH-CENSA, 100 p., 2000.
 108. Hidalgo-Díaz, L.; Bourne, J. M.; Kerry, B. R. and Rodríguez, M.: Nematophagous *Verticillium* spp. in soils infested with *Meloidogyne* spp. in Cuba: Isolation and screening. *Int. J. Pest. Manag.* 46: 277-284, 2000.
 109. Hooper, D. J.: Extraction of free living stages from soil. En: *Laboratory methods for work with Plant and Soil Nematodes* (Southey, J. F. Ed). MAFF Reference Book, 402: 5-30, 1986.
 110. Huang, X.; Zhao, N. and Zhang, K.: Extracellular enzymes serving as virulence factors in nematophagous fungi involved in infection of the host. *Research in Microbiology*, 155: 811-816, 2004.
 111. Hussey, R. S.; R. W. Roncadori (1982): Vesicular- arbuscular mycorrhizae may limit nematode activity and improve plant growth. *Plant Disease* 66: 9-14.
 112. Hussey, R. S; Valerie M. Williamson (1998): Physiological and Molecular Aspects of Nematode Parasitism. Pp. 87-108 En *Plant and Nematode Interactions*. K. Barker, G. Pederson, G. Windham (Eds.) Agronomy Monograph No 36. Madison, Wisconsin, USA.
 113. Hussey, R.S.; Barker, .K. B. (1973): A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. *Plant Dis. Reprtr.* 57: 1025-1028.
 114. Jain, R. K.; C. L. Sethi (1987): Pathogenicity of *Heterodera cajani* on cowpea as influenced by presence of VAM fungi, *Glomus fasciculatum* or *Glomus epigeaus*. *Indian Jour. Nematol.* 17: 165- 170.
 115. Jansson, H. B. and López-Llorca, L. V.: Control of nematodes by fungi. En: *Fungal Biotechnology in Agricultural, Food, and Environmental Applications* (Arora, D. K. Ed). Chapter 18: 205-215, 2004.

116. Johnson, N.C., Fleger, F.L., Crookston, R.K., Simmons, S.R. and Copeland, P.J. 1997. Vesicular- arbuscular mycorrhizas respond to corn and soybean cropping history. *New Phytol*, 117: 657-663.
117. Kamyschko, O. P. (1962): De monilalibus terrestribus novis notula. *Botan. Mater.* (Notul. Syst. Sect. Crypt. Inst. Botan. Acad. Sci. USSR) 15:137-141.
118. Karssen, G. and Moens, M.: Taxonomy and Principal Genera. Root-Knot Nematodes. En: *Plant Nematology* (Perry, R. y Moens, M. Eds). CAB International, Wallingford, UK. Part I, Chapter 3: 60-90, 2006.
119. Kellam, M. K.; N. C. Schenck (1980): Interaction between a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus and root-knot nematodes on soybean. *Phytopathology* 70: 293-296.
120. Kerry B. R.: Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant parasitic nematodes. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 38: 423-441, 2000.
121. Kerry, B. R. and Bourne, J. M. (Eds): A Manual for Research on *Verticillium chlamydosporium*, a Potential Biological Control Agent for Root-Knot Nematodes. *IOBC/WPRS*, University of Gent, 84 p., 2002.
122. Kerry, B. R. and Hidalgo-Díaz, L.: Application of *Pochonia chlamydosporia* in the integrated control of root-knot nematodes on organically grown vegetable crops in Cuba. En: *Multitrophic Interactions in Soil and Integrated Control* (Sikora, R.; Gowen, S.; Hauschild, R. and Kiewinick, S. Eds). *IOBC/WPRS Bull.*, 27(1): 123-127, 2004.
123. Kerry, B. R. and Jaffee, B. A.: "Fungi as biological control agents for plant parasitic nematodes". En: *The Mycota. IV Enviromental and Microbial Relationship* (Wicklów/Soderstrom Eds). Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin, 1997.
124. Kerry, B. R. y Bourne, J.: The importance of rhizosphere interactions in the biological control of plant parasitic nematodes-a case study using *Verticillium chlamydosporium*. *Pesticide Science*, 47(1): 69-75, 1996.
125. Kerry, B. R.: "Exploitation of the Nematophagous Fungus *Verticillium chlamydosporium* Goddard for the Biological Control of Root-knot Nematodes (*Meloidogyne* spp.)". En: *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential* (Butt, T. M.; Jackson, C y Magan, N, Eds). CABI International, Wallingford. Chapter 5: 155-168, 2001.
126. Kerry, B. R.: Fungi as biological control agents for plant parasitic nematodes. In: *Biotechnology of fungi improving plant* (J. M. Whipps y R. D. Lumsden, Eds.), 1989. pág. 153- 170. Cambridge.

127. Kerry, B. R.: Two microorganisms for the biological control of plant parasitic nematodes. Proc. Brighton Crop Prot. Conf. -Pest and Diseases, 1988b, pág. 603 - 607.
128. Kerry, B. R.; Kirkwood, I. A.; de Leij, F. A. A. M.; Barba, J.; Leidjens, M. B. and Brookes, P. C.: Growth and survival of *Verticillium chlamyosporium* Goddard, a parasite of nematodes in soil. *Biocontrol Sci. Technol.*, 3: 355-365, 1993.
129. Kesba, H. H; A. Al-Sayed (2005): Interactions of three species of plant-parasitic nematodes with arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus macrocarpus*, and their effect on grape biochemistry. *Nematology* 7(6): 945-952.
130. Koppenhofer, A. M. (2003): Synergy with microorganisms. Encyclopedia of Pest Control: 1 – 3. Marcel Dekker , Inc. 270 Madison Avenue, NY 10016.
131. Labrada, R. and Fornasari, L. (Eds): "Global Report on Validated Alternatives to the Use of Methyl Bromide for Soil Fumigation". FAO- UNEP, 86 p., 2001.
132. Lambert, D. H., Cole, H. Jr. And Baker, D. E. Adaptation of vesicular-arbuscular mycorrhizae to edaphic factors. En: *New Phytologist*. 1980. 85:513-520.
133. Lambert, K. and Bekal, S.: Introduction to Plant-Parasitic Nematodes. En: *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2002-1218-01, 2002. <http://www.apsnet.org/Education/IntroPlantPath/PathogenGroups/intronematodes/default.htm>. (Consultado enero 2005).
134. Lamberti, F.: "Plant Nematology in developing countries: Problems and Progress. (Proceedings of the Expert Consultation on Plant Nematode Problems and their Control in the Near East Region Karachi, Pakistan 22-26 November 1992)". En: *Plant Nematode Problems and their Control in the Near East Region. FAO Plant Production and Protection Paper*, 144 (Maqbool, M. A. y Kerry, B. R. Eds), 1997. <http://www.fao.org/docrep/V9978E/v9978e00.htm#Contents>. (Consultado mayo 2005).
135. Lawrence, C.J.B. (2003): Evaluación, caracterización y selección de nuevas líneas de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill), de crecimiento indeterminado en condiciones de organopónico. /Trabajo de Diploma); UNAH. 45p.
136. Leij de, F. A. A. M. and Kerry, B. R. (1991): The nematophagous fungus, *Verticillium chlamyosporium*, as a potential biological control agent for *Meloidogyne arenaria*. *Révue de Nématologie* 14:157-164.

137. Leij de, F. A. A. M.; Davis, K. G.; Kerry, B. R.; Leij de, F.A.A.M (1992). The use of *Verticillium chlamyosporium* Goddard and *Pasteuria penetrans* (Thorne) Sayre & Starr alone and in combination to control *Meloidogyne incognita* on tomato plants. *Fundamental and Applied Nematology* 15(3):235-242.
138. Llonín, D.: Nutrición mineral con NPK y biofertilización con hongos MA en el cultivo del tomate en suelos Ferralítico Rojo compactado. Tesis de Maestría. INCA. 1999.
139. López R. Carol Andrea: Identificación de micorrizas nativas arbusculares (MA) en cultivos de Mora (*Rubus glaucus*), en diez localidades de seis municipios del Departamento de Boyacá. Proyecto de Grado presentado a la escuela de Biología como requisito para optar al título de Bióloga. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Tunja, Noviembre de 2003.
140. López-Llorca, L. V.: Ecología de los hongos nematófagos en el suelo y rizosfera: Modo de acción y aplicaciones prácticas. VI Seminario Científico Internacional de Sanidad Vegetal. Palacio de las Convenciones de La Habana, Cuba. 2008. Libro de resúmenes.
141. López-Llorca, L. V.; Bordallo, J. J.; Salinas, J.; Monfort, M. L. and López-Serna, M. L.: Use of light and scanning electron microscopy to examine colonisation of barley rhizosphere by the nematophagous fungus *Verticillium chlamyosporium*. *Micron*, 33: 61-67, 2002a.
142. López-Llorca, L. V.; Olivares-Bernabeau, C.; Salinas, J.; Jansson, H. B. and Kolattukudy, P. E.: Prepenetration events in fungal parasitism of nematode eggs. *Mycol. Res.*, 106: 499-506, 2002b.
143. Luc, M.; SiKora, R. A. and Bridge, J. 2005: Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. 2nd edition. CABI.
144. Maestrey, A.: Fertilización del tomate cultivado en primavera. [Tesis de Doctorado]; ISCAH, 1986. 97p.
145. Márquez, M. E.; Garmendía, L.; Fernández, E. y Escobar, M.: "Cepas de *Bacillus thuringiensis* con actividad biológica contra *Meloidogyne incognita*". *Fitosanidad*, 8 (3): 31-35, 2004.
146. Márquez, M. E.; Torres, L. y Escobar, M.: Evaluación del efecto nematicida de cepas de *Bacillus* spp. *Fitosanidad*, 7(2): 55-58, 2003.
147. Matthiessen, J.; J. Kirkegaard. (2006): Biofumigation and Enhanced Biodegradation: Opportunity and Challenge in Soilborne Pest and Disease Management. *Critical Reviews in Plant Sciences* 25 (3): 235-265.

148. McSorley, R. a McGovern, R. J.: Effects of Solarization and Ammonium Amendments on Plant-Parasitic Nematodes. *Journal of Nematology*, 32(4S): 537-541, 2000.
149. Medina, N: La biofertilización como alternativa para la nutrición mineral del tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill)). En: Reunión Latinoamericana de Rhizobiología. Programa y Resúmenes. Taller Internacional Bioferto "94. (17,3:1994: La Habana), 1994.p .106 – 107.
150. Mena, J.: Determinación de cepas bacterianas con actividad nematocida. Tesis de Doctor en Ciencias Agrícolas. CIGB Camagüey. Universidad Central de Las Villas, 112 p., 2004.
151. Mena, J.: Manual de aplicación del bionemático HeberNem-L. CIGB. Camaguey, Cuba, 10 p., 2005.
152. Mena, J.; E. Pimentel, L. Veloz, A. T. Hernández, Y. Ramírez, L. León, G. Jiménez, G. García, C. Borroto, M. Pujol, I. Wong, M. Fleitas. (2004): HeberNem: Posible sustituto del Bromuro de Metilo en los cultivos protegidos. En *V Seminario Internacional de Sanidad Vegetal*. Mayo 24 al 28, Ciudad de la Habana, Cuba. Memorias: CD ISBN 959-246-137-6.
153. Mendez, Mayra; A. Polanco (2000): Efectividad de *Trichoderma harzianum* cepa A34, en el control del nematodo *Rotylenchulus reniformis* en el cultivo de la lechuga (*Lactuca sativa*). Pp 14. En *Forum Tecnológico de Manejo Integrado de Plagas*. INISAV, Ciudad Habana. (Resumen).
154. Mendoza de Gives, P.; Behnke, J. M. and Davies, K. G.: Extracellular enzyme production by nematophagous fungi in the presence and absence of nematodes. *International Journal of Nematology*, 13(1): 27-36, 2003.
155. Menezes dos Santos, J.R. Producción de Tomate en América Latina y el Caribe. En: Producción, postcosecha, procesamiento y comercialización del ajo, cebolla y tomate. Santiago de Chile: FAO, 1992. 413 p.
156. Miguel, A. (1997): *Injerto de Hortalizas*. Serie Divulgación Técnica. Generalitat Valenciana. Conselleria de Agricultura, Pesca y Alimentación (Eds.); 88 pp.
157. MINAGRI. Instructivo Técnico del cultivo del tomate. La Habana. 1984.
158. MINAGRI. Metodología para la interpretación de análisis de suelo. La Habana. 1980.
159. Montes de Oca, N.: (2004): Buenas prácticas de fabricación para la obtención de un bionemático a partir de la cepa Vcc 108 de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*. Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. UNAH-CENSA. 152 pp.

160. Montes de Oca, N.; Arévalos, J.; Acosta, N. y Hidalgo-Díaz, L.: "Herramientas para el control de la calidad de la cepa IMI SD 187 de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (Kamyscho ex Barron y Onions) Zare y W. Gams. *Rev. Protección Veg.*, 20(2): 86-92, 2005a.
161. Montes de Oca, N.; Arevalos, J.; Acosta, N.; Peteira, B.; Hidalgo-Díaz, L. y Kerry, B. R.: Estabilidad de la cepa IMI SD 187 de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*. Parte I. Indicadores morfológicos, productivos y patogénicos". *Rev. Protección Veg.*, 20(2): 93-100, 2005b.
162. Morgan-Jones, G.; White, J. F.: y Rodríguez-Kábana, R.: Phytonematode Pathology: Ultrastructural Studies. I. Parasitism of *Meloidogyne arenaria* eggs by *Verticillium chlamydosporium*. *Nematropica*, 13: 245-260, 1983.
163. Morton J. B. Evolutionary relationships among arbuscular mycorrhizal fungi in the endogonaceae. *Mycologia*, 1990 b. 82: 192-207.
164. Morton J. B. Species and clones of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales, Zygomycetes): their role in macro and microevolutionary processes. En: *Micotaxón*, 1990 a 37: 493-515.
165. Morton J. B. Taxonomy of VA mycorrhizal fungi: Clasificación, nomenclature and Identification. En: *Micotaxon*, 1988. 32: 267-324.
166. Morton, C. O.; Hirsch, P. R and Kerry, B. R.: Infection of plant-parasitic nematodes by nematophagous fungi - a review of the application of molecular biology to understand infection process and to improve biological control. *Nematology*, 6(2): 161-170, 2004.
167. Morton, J. B and D. Redecker: Two new families of Glomales: *Anchoesporaceae* y *Paraglomaceae* with two genera *Anchoespora* y *Paraglomus*, based on concordant molecular and morphological characters. *Mycología*. 2000. 93 (1) p- 181-185.
168. Morton, O. C.; Mauchline, T. H.; Kerry, B. R. and Hirsch, P. R.: PCR - based DNA fingerprinting indicates host – related genetic variation in the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*. *Mycol. Res.*, 107: 198-205, 2003b.
169. Muiño, Bertalina. (2008): Manejo Integrado de Plagas en la Producción Protegida. Clase en Programa Doctoral Colaborativo de Sanidad Vegetal. CENSA. (power point- inédito).
170. Naqvi, Nikhat S.; S.A.M.H. Naqvi (2004): Mycorrhiza in Management of Fruits and Vegetables Diseases. Pp. 537-558n *Diseases of Fruits and Vegetables, Volume II*. S.A.M.H. Naqvi (Ed.), Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.

171. Netscher, C.; Sikora, R.A.. (1990): Nematodes parasites of vegetables. Pp. 237-283 En: *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*. Luc, M.; Sikora, R.A.; Bridge, J. (Eds.) CAB International. Institute of Parasitology. UK.
172. Nicol, J. M.: Important nematodes pests. En: *Bread wheat: Improvement and production* (Curtis, B. C.; Rajaram, S. y Gómez-Macpherson, H. Eds). FAO, *Plant Production and Protection Series*, 30: 345-366, 2002.
173. Noling, J. W.: Nematode Management in Tomatoes, Peppers and Eggplant. Document ENY-032 (NG032), Series of the Entomology & Nematology Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, 14p., 1999. <http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/NG/NG03200.pdf> (Consultado abril 2005).
174. Noval, de la M. B.: Efecto de la Interacción Hongos Micorrízicos Arbusculares – Sistemina – Tomate (*Solanum lycopersicon* L) sobre proteínas de defensa y respuesta a patógenos. Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. La Habana. 2008.
175. Novella, R. y Medina, N. La fertilización con hongos micorrizógenos como fuente de nitrógeno para la producción de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). En: IV Taller de Biofertilización en los Trópicos. Programa y Resúmenes. XI Seminario Científico del INCA.(4: 1998 : La Habana), 1998.p-190.
176. NRAG. 837-87. 1987. Suelos. Análisis químico. Reglas generales.--Ciudad de la Habana: MINAGRI, Cuba.
177. NRAG. 892-88. 1988. Suelos. Análisis químico. Reglas generales.--Ciudad de la Habana: MINAGRI, Cuba.
178. Nuez, F. (1995): El Cultivo del Tomate. Madrid.: Ediciones. Mundi. Prensa. 793p.
179. Ornat, C.; F. J. Sorribas. (2008): Integrated Management of Root-knot Nematodes in mediterranean horticultural crops. Pp. 295–319. En *Integrated Management and Biocontrol of Vegetable and Grain Crops Nematodes*. A. Ciancio & K. G. Mukerji (eds.). Springer.
180. Orozco, H.: Investigaciones sobre Micorrizas en Colombia. En: Sociedad Colombiana de la Ciencia del Suelo No. 2. Regional de Antioquia. Medellín. 1988.
181. Orozco, M. O.: Micorrizas VA, micelio extramátrico y otras poblaciones microbianas asociadas a troncos en descomposición en un bosque tropical.

- En: Informe N° 18. Ciclo lectivo sobre el tema de investigación en micorrizas. IFS: Stocklm, 1986. p. 251-271.
182. Oyekanmi, E.O.; D. L. Coyne; O. E. Fagade; O. Osonubi. (2007): Improving root-knot nematode management on two soybean genotypes through the application of *Bradyrhizobium japonicum*, *Trichoderma pseudokoningii* and *Glomus mosseae* in full factorial combinations. *CROP PROTECTION* 26: 1006-1012
 183. Paneque, V. M y Calaña, J. M. La fertilización de los cultivos. Aspectos teóricos prácticos para su recomendación. Departamento de Biofertilizantes y Nutrición de las Plantas. INCA. La Habana 2001.
 184. Paneque, V. M y Calaña, J. M. Manual de técnicas analíticas para suelo, foliar y fertilizantes químicos. INCA. La Habana. 72 p. 2000.
 185. Paneque, V.M. Abonos Orgánicos. Conceptos prácticos para su evaluación y aplicación. Departamento de Biofertilizantes y Nutrición de las Plantas. INCA. La Habana 1998.
 186. Paulitz, T.C. (2000): Population dynamics of biocontrol agents and pathogens in soils and rhizospheres. *European Journal of Plant Pathology* 106: 401–413.
 187. Peralta, I.E.; Knapp, S.; Spooner, D.M. (2006). Nomenclature for wild and cultivated tomatoes. TGC Report 56: 6-12.
 188. Peralta, I.E.; Spooner, D.M. (2005). Morphological characterization and relationships of wild tomatoes (*Solanum* L. Section *Lycopersicon*) Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot Gard. 104:227-257.
 189. Pérez, Alina; Grisell Pérez; Mercedes González; L. Castellanos. (2004a): Control biológico de nematodos noduladores en tomate bajo casas de cultivo protegido como una alternativa a la sustitución del bromuro de metilo. En *V Seminario Internacional de Sanidad Vegetal*. Mayo 24 al 28, Ciudad de la Habana, Cuba. Memorias: CD ISBN 959-246-137-6.
 190. Pérez, Ana L.; Julio Gutierrez; Yordanis Delgado. (2004b): Manejo integrado para el control de nematodos en cultivos protegidos. Ponencia presentada al Forum de Ciencia y Técnica. Grupo Empresarial Agropecuario del Ministerio del Interior de la República de Cuba. 8pp (inédito) (facilitada por la autora).
 191. Peteira, B. Esteves, I. e Hidalgo – Díaz, L.: Detección de proteasas producidas por *Pochonia chlamydosporia* en medio sólido. *Rev. Protección Veg.* Vol. 21 No. 3 (2006): 186 -190p.

192. Peteira, B.: Caracterización del hongo nematófago cepa IMI SD 187 de *Pochonia chlamydosporia* var *catenulata* (Kamyscho ex Barron y Onions) Zare y Gams. Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. UNAH-CENSA, 118 p., 2005.
193. Peteira, B.: Caracterización del hongo nematófago cepa IMI SD 187 de *Pochonia chlamydosporia* var *catenulata* (Kamyscho ex Barron y Onions) Zare y Gams. Rev. Protección Veg. Vol. 21 No. 2 (2006): 123p.
194. Peteira, B.; Estévez, I.; Atkins, S.; Hidalgo-Díaz, L.; Montes de Oca, N. y Kerry, B. R.: Estabilidad de la cepa IMI SD 187 de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*. Parte II. Indicadores Bioquímicos. Rev. Protección Veg., 20(2): 102-109, 2005a.
195. Phillips, J. M. and Hayman, D. S.: Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 55: 158-161, 1970.
196. Plana, D. (1996): Evaluación de la radio sensibilidad de tres variedades cubanas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). (Trabajo de Diploma); ISCAH. 43 p.
197. Plenchette, C. and Morel, C.: External phosphorus requeriment of mycorrhizal and non-mycorrhizal barley and soybean plants. *Biol. Fertil. Soils*. 1996. 21: 303-308.
198. Ploeg, A. (2008): Biofumigation to manage plant- parasitic nematodes. Pp. 239 – 248. En *Integrated Management and Biocontrol of Vegetableand Grain Crops Nematodes*. A. Ciancio & K. G. Mukerji (eds.). Springer.
199. Ploeg, A.T.: Effect of selected Marigold on root-knot nematodes and tomato and melon yields. *Plant Dis.*, 86: 505-508, 2002.
200. PNO-PA-058: Procedimiento para matar, fijar y contar nematodos. Documento básico. Grupo Plagas Agrícolas. Laboratorio de Nematología.
201. Puertas, A. y Hidalgo –Díaz, L.: Influencia de la planta hospedante y su interacción con *Meloidogyne incognita* sobre la efectividad de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*. Rev. Protección Veg. Vol.22 (No.2).2007.p 104-109.
202. Puertas, A.: Uso de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (kamyscho ex Barron y Onions) Zare y Gams como Agente de Control Biológico de *Meloidogyne incognita* (kofoid y white) chitwood en cultivos hortícolas. Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. La Habana, 2007. p 100.

203. Puertas, A.; Arévalo, J.; Montes de Oca, N.; Miranda, I. e Hidalgo - Díaz, L.: Efecto de diferentes concentraciones de inóculo de la cepa IMI SD 187 de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* en el control de *Meloidogyne incognita* .Rev. Protección Veg. Vol.21 (No.2).2006, p.74-79.
204. Puertas, A.; Blanca M. de la Noval.; Martínez, B.; Miranda, I.; Fernández, F. e Hidalgo - Díaz, L.: Interacción de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* con *Rhizobium* sp., *Trichoderma harzianum* y *Glomus clarum* en el control de *Meloidogyne incognita* .Rev. Protección Veg. Vol.21 (No.2).2006, p.80-89.
205. Pulido, L. y Peralta, H.: Uso de biofertilizantes en la producción de posturas de tomate. En: Programa y Resúmenes. Seminario Científico del INCA y Taller de Biofertilización en los trópicos.(10, 3: 1996 : La Habana), 1996 (b).p.87.
206. Rao, M. S.; B. R. Kerry; S. R. Gowen; Jou M. Bourne; P. Parvatha Reddy. (1997): Management of *Meloidogyne incognita* in tomato nurseries by integration of *Glomus deserticola* with *Verticillium chlamydosporium*. *Jour. Plant Dis. Protec.*104 (4): 1-4.
207. Rao, M. S.; P. P. Reddy; M. Nagesh. (2000). Management of *Meloidogyne incognita* on tomato by integrating *Glomus mosseae* with *Pasteuria penetrans* under field conditions. *Ecosystems* 6(2):130-134.
208. Rao, M. S.; S. R. Gowen. (1998): Bio-management of *Meloidogyne incognita* on tomato by integrating *Glomus deserticola* and *Pausteria penetrans*. *Jour. Plant Dis. Protec.* 105(1):49-52.
209. Read, D.J. Mycorrhiza-The state of the art. En: Mycorrhiza 2nd. (A. Varma y B. Hock, eds.). Springer-Verlag, Berlín, Heidelberg. p. 3-34, 1999.
210. Ritter, M. (1973): Cycles et developpement des *Meloidogyne*. *OEPP/EPPO Bull* (9): 53-59.
211. Rivera, R., Fernández, F., Hernández, A., Martín, J. R. y Kalyanne Fernández. El Manejo Efectivo de la Simbiosis Micorrízica. Una vía hacia la Agricultura Sostenible. Estudio de caso. El Caribe. Ediciones INCA. 166 p. 2003.
212. Rodríguez, A.: La Agricultura Urbana en Cuba. Impactos económicos, sociales y productivos. *Revista Bimestre Cubana*, XCV (20): 115-137, 2004.
213. Rodríguez, J. y Álvarez, M. (1995): Caracterización de variedades y especies silvestres de tomate (*Lycopersicon* sp). (Trabajo de Diploma); ISCAH. 63p.
214. Rodríguez, Mayra. G. y Gómez, Lucila: Los Nematodos Fitoparasitos. Diagnostico e importancia. Curso a especialistas venezolanos, Nov.2008. Comunicación Personal.

215. Rodríguez, Mayra G. (2000): Identificación y caracterización de *Meloidogyne mayaguensis* (Nemata: *Meloidogynidae*) en el cafeto en Cuba. Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. UNAH-CENSA, La Habana, Cuba. 100pp.
216. Rodríguez, Mayra G.; Gómez, Lucila, Díaz – Viruliche, Luisa. (2007b): Alternativas para la sustitución del bromuro de metilo en el manejo de nematodos formadores de agallas (*Meloidogyne* spp.). (Revisión de literatura 1995 – 2006). CD 1^{er} Curso Internacional de Nematología. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas – Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria – Universidad Central de Venezuela. Marzo 13 al 17 del 2007. Editado por INIA. Documento PDF, 25pp.
217. Rodríguez, Mayra G.; Gómez, Lucila; Cuadra, R.; Díaz-Viruliche, Luisa; Fernández, E.; Casanova, A.; González, E.; Sánchez, Lourdes; González, Farah M.; Hidalgo, L.; Gómez, Olimpia; Hernández, J. C.; Depestre, T.; Hernández, M. A.; Cruz, Xiomara; Miranda, Ileana; Piñón Gómez, Maite; Hernández, A.. (2006): Nematodos formadores de agallas en Sistemas de Cultivos Protegidos: Diagnostico y Manejo. Informe Final de Proyecto. Programa Ramal de Hortalizas - MINAG. 171pp. (Inédito – Laboratorio de Nematología CENSA).
218. Rodríguez, Mayra G.; Gómez, Lucila; Peteira, Belkis. (2007a): *Meloidogyne mayaguensis* Rammah y Hirschmann, plaga emergente para la agricultura tropical y subtropical. *Rev. Protección Veg.* 22 (3) (En prensa).
219. Rodríguez, Mayra G.; Lucila Gómez; Belkis Peteira. (2007b). *Meloidogyne mayaguensis* Rammah y Hirschmann, plaga emergente para la agricultura tropical y subtropical. *Rev. Protección Vegetal.* 22 (3).
220. Rodríguez, Mayra G.; Rodríguez, I.; Sánchez, Lourdes (1995): Especies del género *Meloidogyne* que parasitan el cafeto en Cuba. Distribución geográfica y sintomatología. *Rev. Protección Veg.*, 10: 123-126.
221. Rodríguez, Mayra G.; Sánchez, Lourdes; Gómez, Lucila; Hidalgo, L. González, E.; Gómez, Maylén; Díaz-Viruliche, Luisa; Casanova, A.; Cuadra, R.; Fernández, E.; Hernández, R. (2005): *Meloidogyne* spp., Plaga de las hortalizas: Alternativas para su manejo en sistemas de cultivos protegidos. *Rev. Protección Veg.* 20 (1): 1-10.
222. Rodríguez, Mayra; Gómez, Lucila y Díaz Viruliche Luisa. (2007): Alternativas para la sustitución del Bromuro de Metilo en el manejo de nematodos formadores de agallas (*Meloidogyne* spp.). (Revisión de literatura 1995-

- 2006). CD Primer Curso Internacional de Nematología. Maracay, Venezuela. Abril 2007.
223. Rodríguez, N. A. (2003a). Los huertos intensivos (la experiencia de Cuba). En: Manual de Agricultura Orgánica Sostenible. FAO-INIFAT (Agrinfor). La Habana, pp. 75-82.
224. Rodríguez, N. A. (2003b). La huerta organopónica cubana. En: Manual de Agricultura Orgánica Sostenible. FAO-INIFAT (Agrinfor). La Habana, pp. 63-70.
225. Rodríguez, Y. Yakelin; Noval, P. Blanca; Fernández, M. F. y Rodríguez, H. P. (2004): Estudio comparativo del comportamiento de seis cepas de hongos micorrízicos arbusculares en su interacción con el tomate (*Lycopersicon esculentum* M. var. "Amalia"). Ecol. apl. V.3 n.1-2 Lima, Perú.
226. Rosendhal, S; Rosendhal, C. Y Thingstrup, I.: The use of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal (VAM) fungi as bio control agent. En: New approaches in biological control of soil borne diseases. D. Jensen, J. Hockanull and N. Fokkena (Eds) IOBC/WTRS Bulletin. 1992. P.48-50.
227. Ruelo, J. S. (1983): Integrate control of *Meloidogyne incognita* on tomato using organic amendments, marigolds and nematicide. *Plant Disease Rep.* 67: 671-673.
228. Rumbos, C.; S. Reimann; S. Kiewnick; R. A. Sikora. (2006): Interactions of *Paecilomyces lilacinus* strain 251 with the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*: Implications for *Meloidogyne incognita* control on tomato. *Biocontrol Science and Technology* 16 (9): 981-986.
229. S.A.S.: Statistical Analysis System, Release 8.02. *SAS Institute Inc, Cary, North Caroline, USA, 2004.* Versión 9.0.
230. Sánchez de P. y Sieverding, E.: Efecto de *G. mosseae* en varios cultivos comerciales del Valle del Cauca. Universidad Nacional de Colombia-Palmira. 1997. 20 p. Inédito.
231. Sánchez de Prager, M.: Endomicorrizas en Agroecosistemas Colombianos. Generalidades de la Micorriza. Primera parte. Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira. 1995. p. 33-92.
232. Sánchez, L.; Rodríguez, M. y Rodríguez, I.: *Meloidogyne grahami* Golden y Slana: Nuevo parásito del tabaco en Cuba. *Rev. Protección Veg.*, 9: 89-91, 1994.
233. Sánchez, Lourdes y Mayra G. Rodríguez. (1998): Complejo de especies de *Meloidogyne*, presentes en tabaco y evaluación de plantas indicadoras para su detección. Informe PNCT Bioetnología. 48pp. (inédito)

234. Schwob, I.; M. Ducher; A. Coudret. (1999): Effects of climatic factors on native arbuscular mycorrhizae and *Meloidogyne exigua* in a Brazilian rubber tree (*Hevea brasiliensis*) plantation. *Plant Pathology* 48: 19–25.
235. Secilia, J y Bagyaraj, D.J. Selection of efficient vesicular- arbuscular mycorrhizal fungi (Endogonaceae) from Florida. *Mycologia*. 1982, 74. 77-92.
236. Segers, R.: The nematophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium*, aspects of pathogenecity. PhD Thesis, University of Nottingham, UK, 222 p., 1996.
237. Segers, R.; Butt, T. M.; Carder, J. H.; Keen, J. N.; Kerry, B. R. and Feberdy, J. F.: The subtilisins of fungal pathogens of insects, nematodes and plants: distribution and variation. *Mycol. Res.*, 103(4): 395-402, 1999.
238. Segers, R.; Butt, T. M.; Kerry, B. R.; Beckett, A. and Feberdy, J. F.: The role of the proteinase VCP1 produced by the nematophagous *Verticillium chlamydosporium* in the infection process of nematodo eggs. *Mycol. Res.*, 100: 421-428, 1996.
239. Shenck, N. C. and Pérez, Y.: Manual for the identificacion of VA mycorrhizal fungi. Gainesville USA. 1997.
240. Siddiqui, Z. A. and Mahmood, I.: Some observations on the management of the wilt disease complex of pigeonpea by treatment with a vesicular arbuscular fungus and biocontrol agents for nematodes. *Bioresource-Technology*, 54(3): 227-230, 1995.
241. Siddiqui, Z. A.; M. S. Akhtar. (2008): Synergistic effects of antagonistic fungi and plant growth promoting rhizobacterium, an arbuscular mycorrhizal fungus, or composted cow manure on populations of *Meloidogyne incognita* and growth of tomato. *Biocontrol Science and Technology* 18 (3): 279 -290.
242. Siddiqui, Z.; M. Akhtar (2007): Effects of AM fungi and organic fertilizers on the reproduction of the nematode *Meloidogyne incognita* and on the growth and water loss of tomato. *Biology & Fertility of Soils* 43 (5): 603-609.
243. Sieverding, E and Toro, S. 1988. Influence of soil water regimes on VA mycorrhiza. V. Performance of diferente VAM fungal species with cassava. *J. Agron. Crop Sci.*, 161: 322-332.
244. Sieverding, E. y Toro, S. Los Géneros de la familia Endogonaceae y su Ecología. Investigaciones sobre Micorrizas en Colombia. En: Sociedad Colombiana en la Ciencia del Suelo. No. 2. 1988. p. 25-53.
245. Sieverding, E.: Vesicular Arbuscular Mycorrhiza. Management in tropical agrosystems. Technische Zusammenarbeit. (GTZ). República Federal de Alemania. 1991. p 367.

246. Silveira, J. O. e Franco. A. A.: Biotecnología do solo. Fundamentos e perspectivas. Brasilia: MEC Ministerio da Edacacao, ABEAS; Lavras: ESAL, Faepe. 1992, p125-177.
247. Sitaramaiah, K.; R. A. Sikora (1982): Effect of mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatum* on the host parasite relationship of *Rotylenchulus reniformis* in tomato. *Nematologica* 28: 412-419.
248. Sivaprasad, P.; A. Jacob; S. K. Nair; B. George. (1990): Influence of VA mycorrhizal colonization on root knot nematode infestation in *Piper nigrum* L. Pp. 100-101 En *Trends in Mycorrhizal Research, Proc. National Conf. On Mycorrhiza*. B. S. Jatali and H. Chand (Eds.). Haryana Agricultural Univ. Hissar.
249. Smhit, S. E. and Gianinazzi - Pearson, V.: Physiological interactions between symbionts in vesicular arbuscular mycorrhizal plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1988. 39: 221-244.
250. Smith, D. L., and C. Hamel. *Crop. Yield, Physiology and Processes*. Springer-Verlang Berlín Heidelberg. 1999. 334-351.
251. Smith, G. S. (1987): Interaction of Nematodes with Mycorrhizal Fungi. Pp. 292- 300 En *Vistas on Nematology*. A Commemoration of Twenty-fifth Anniversary of Soc. of Nematologists. J. A. Veech & D. W. Dickson (Eds.). Published by Soc. Nematologist, Inc. Hyattsville, Maryland.
252. Smith, G. S.; R. S. Hussey; R. W. Roncadori. (1986): Penetration and post infection development of *Meloidogyne incognita* on cotton as affected by *Glomus intraradicens* and phosphorus. *Jour. Nematol.* 18: 429- 435.
253. Stefanova, M. y Fernández, E.: Principales Patógenos del Suelo en las Hortalizas y su Control. En: *Producción Intensiva de Hortalizas en los Trópicos Húmedos* (Labrada, R. Ed.): 111-120. División de Producción y Protección Vegetal, FAO, Roma, 1995.
254. Stirling, G. R. (1991): *Biological Control of Plant Parasitic Nematodes: Progress, Problem and Prospects*. CAB International, Wallingford, Oxon. 282pp.
255. Strullu, D. G. Les mycorrhizees des abres et plantes cultives. Techniques des abres et documentation. Paris: Lavoiser, 1991.
256. Stürner, S. and J. Morton. Developmental Patterns Defining Morphological Characters in Spores of Four Species in *Glomus*. *Mycologia*. 1997. 89 (4): 72-81.
257. Suarez, Zoraida; A. Rondón; V. Tellechea; R. Solórzano; R. Navas. Asociación de hongos del suelo con

- nematodos fitoparasitos en aguacatero. *Agronomía Tropical*. 42 (5-6): 321-328.1992.
258. Subbotin, S. A.; Moens, M. (2006): Molecular taxonomy and phylogeny. Pp 33-58. En: *Plant nematology*. Perry, R. y Moens, M. (Eds). CABI, UK.
259. Sylvia, D. M.: Mycorrhizal symbioses. Mycorrhiza. <http://www.ifas.ufl.edu/dmsa/mycorrhiza.htm>. Agos. 27. 1997. 13 p.
260. Tayeta, A.: Approaches for the reduction of the use of methyl bromide and alternatives in Japan. En: *Global Report on Validated Alternatives to the Use of Methyl Bromide for Soil Fumigation* (Labrada, R. y Fornasari, L. Eds): 59-69, 2001.
261. Taylor, A. L. and Sasser, J. N.: Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). Cooperative publications, Dept. Plant Pathology, North Carolina State Univ. and U.S. Agency of International Development, Raleigh, 111 p., 1978.
262. Thomas, C. (1993): The polymerase Chain Reaction. Pp. 117-140. En: *Methods in plant biochemistry*. Vol. 10. Academic Press Limited.
263. Tikhonov, V. E.; López-Llorca, L. V.; Salinas, J. and Jansson, H. B.: "Purification and characterization of chitinases from the nematophagous fungi *Verticillium chlamyosporium* and *V. suchlasporium*". *Fungal genetics and biology*, 35: 67-78, 2002.
264. Trivedi P. C.: Plant Nematode Management (A Biocontrol Approach).1998, First Edition. University of Rajasthan. Jaipur (Rajasthan) India.
265. Trouvelot, A; Kough, J and Gianinazzi-Pearson, V.: Mesure du taux de mycorrhization VA d'un systeme racinaire. Recherche de methods d'estimation ayantunes signification fonctionelle. Proceedings of the 1st European symposium on mycorrhizae: physiological and genetical aspects of mycorrhizee, Dijón, 1-5 July, 1985. (V. Gianinazzi-Pearson y S. Gianinazzi, Eds). INRA. P.217-222, 1986.
266. Trudgill, D. L. and Blok, V. C.: Apomictic polyphagous root-knot nematodes: exepcionally successful and damaging biotrophic root pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 39: 53-77, 2001.
267. Trudgill, D. L.: Parthenogenetic root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.); how can these biotrophic endoparasites have such enormous host range. *Plant Pathology*, 46: 26-32, 1997.
268. Urbano, E: Proyecto Alternativas al Uso de Bromuro de Metilo para Flores de Verano en el Ecuador. En: *Memorias V Seminario Internacional de Sanidad Vegetal*, Ciudad de la Habana, Cuba, 24-28 mayo, 2004.

269. Van Gundy, S. D.: Ecology of *Meloidogyne* spp.-Emphasis on environmental factors affecting survival and pathogenicity. En: *An Advanced Treatise on Meloidogyne, Volume 1: Biology and Control* (Sasser, J. N. and Carter, C. C. Eds). North Carolina State University Press, Raleigh, NC. Chapter: 15: 178-182, 1985.
270. Vázquez, L. L.; E. Fernández. 2007. Bases para el Manejo Agroecológico de Plagas en Sistemas Agrarios Urbanos. Editorial CIDISAV. Asociación Cubana de Técnicos Agrícolas y Forestales - Instituto nacional de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Cuba. 121pp.
271. Verdejo-Lucas, S.; Sorribas, F. J.; Ornat, C. and Galiano, M.: Bel Evaluating *Pochonia chlamydosporia* in a double-cropping system of lettuce and tomato in plastic houses infested with *Meloidogyne javanica*“. *Plant Pathology*, 52: 521–528, 2003.
272. Viaene, N. M. and Abawi, G. S.: *Hirsutella rhossiliensis* and *Verticillium chlamydosporium* as Biocontrol Agents of the Root-knot Nematode *Meloidogyne hapla* on Lettuce. *Journal of Nematology*, 32(1): 85-100, 2000.
273. Waceke, J. W.; S. W. Waudu; R. Sikora (2001): Suppression of *Meloidogyne hapla* by arbuscular mycorrhiza fungi (AMF) on pyrethrum in Kenya. *International Jour. Pest Management* 47(2) 135-140.
274. Wacere, J. W.; S. W. Waudu; R. Sikora. (2002): Effect of inorganic phosphatic fertilizers on the efficacy of an arbuscular mycorrhiza fungus against a root-knot nematode on pyrethrum. *International Jour. Pest Management* 48 (4): 307- 313.
275. Wang, D. Y. C., S. Kumar; B.S. Hedges. (1999): Divergence time estimates for the early history of animal phyla and the origin of plants, animals and fungi. *Proc. R. Soc. London*. 266: 163-171.
276. Wang, K. H.; Sipes, B. S. and Schmitt, D. P.: *Crotalaria* as a cover crop for nematode management: A review. *Nematropica*, 32: 35-57, 2002.
277. Whitehead, A. G.: Plant nematode control. CAB International, Wallingford, UK, 384 p., 1998.
278. Widmer, T. L., Mitkowski, N. A. and Abawi G. S.: “Soil Organic Matter and Management of Plant-Parasitic Nematodes“. *Journal of Nematology*, 34(4): 289–295, 2002.
279. Williamson, V. M.: Root Knot Nematode resistance genes in tomato and their potential for future use. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 36: 277-293, 1998.
280. Wright, D. and Perry, R.: Nematode Biology and Plant Responses. Reproduction, Physiology and Biochemistry. En: *Plant Nematology* (Perry, R.

- y Moens, M. *Eds*). CAB International, Wallingford, UK. Part II, Chapter 7: 188-207, 2006.
281. Wyss, U. (1997): Root Parasitic Nematodes: An Overview. Pp. 5-22. En *Cellular and Aspects of Plant- Nematode Interactions*. C. Fenoll; F. M. W. Grundler; S. A. Ohi (Eds.). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht / Boston / London.
282. Zeck, W. M. 1971: Aranting scheme for field evaluation of root – knot nematode infestations. *Pflanzenchutz – Nachr. Bayer* 24: p 141 – 144.

Anexo 1.**Informe del análisis del control de calidad.**Producto: **KlamiC® cepa IMI SD 187. (Pochonia chlamydosporia var.catenulata).**Lote: **311106**

Analista: Téc. Nerdys Acosta

Fecha de fabricación: 24/11/2006

Fecha de análisis: 28/11/2006

Método de obtención: Fermentación en estado líquido y sólido en bolsas de polipropileno.

Requisitos e indicadores de calidad.	Cumplimiento.	Referencia.
1- Características Organolépticas. Bolsas de polipropileno que contienen un granulado de color ocre.	Cumple	Norma interna.
2- Masa promedio. 500g ó 1kg ± 10%.	Cumple	USP XXIII, 1995.
3- Identidad. Conidios en cadenas y presencia de Clamidosporas.	Cumple	PNO-G-219. Kerry y Bourne, 2002.
4- Concentración del principio activo. 10 ⁶ clamidosporas por g de sustrato.	Cumple (9,5 x 10 ⁶)	Kerry y Bourne, 2002. PNO-G-226.
5- Actividad Biológica. 85% de Viabilidad de las clamidosporas. 70% de Parasitismo de huevos.	Cumple (93%) Cumple (82%)	Kerry y Bourne, 2002. Kerry y Bourne, 2002. PNO-G-262 y PNO-G-273.
6- Contaminación microbiana. Menor de 10 ⁵ UFC x g ⁻¹ de producto. No presencia de bacterias, ni hongos patógenos.	Cumple (No presenta)	Limite Microbiano USP XXV, 2002. PNO-AM-007.
7- Contenido de agua. de 7%.	Cumple (5,85%)	USP XXV, 2002. Balanza infrarroja IE-201.
8- Hermeticidad. Bolsas de polipropileno herméticas.	Cumple	FEUM, 1998. PNO-G-283.
9- Resultados: Aprobado: <u> A </u> Rechazado: <u> ___ </u>		

Lic. Jersys Arévalo.

Jefe de control de la calidad.

Documento Básico RPNO-G-475 del libro de control de Calidad del producto perteneciente a la Unidad de Desarrollo de Agentes de Control Biológicos del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), del año 2006.