

CONTROL DE *Meloidogyne* spp. EN ALMÁCIGOS DE CAFÉ CON EL HONGO *Paecilomyces lilacinus*¹.

Mario Andrés Giraldo-Fadul* ; Jairo Eduardo Leguizamón-Caycedo**; Bernardo Chaves-Córdoba**

RESUMEN

GIRALDO F., M.A.; LEGUIZAMÓN C., J.E. Control de *Meloidogyne* spp. en almácigos de café con el hongo *Paecilomyces lilacinus*. Cenicafé 49(2): 85-101. 1998

Se evaluó el control que ejerce el hongo *Paecilomyces lilacinus* sobre *Meloidogyne* spp. en almácigos de café. En un experimento mediante análisis "probit" se determinó la DL₅₀ del hongo obtenido en 25g de arroz, sobre el nematodo. En otro se evaluó el efecto del hongo multiplicado en 25g y 50g de arroz en aplicación total y fraccionada, además comparando el resultado con el tratamiento químico; se observó que todos los tratamientos aplicados redujeron significativamente el número de estados juveniles (J2) del nematodo, cien días después del trasplante. El tratamiento químico, fenamifos 1g PC/bolsa 10 días después del trasplante y el hongo en dosis total de 50g (2,1 x 10⁹ esporas/g de arroz) presentaron el menor grado de infección, así como diferencias altamente significativas respecto al testigo en el número de huevos. Dosis fraccionadas del hongo no mejoraron el control. En un tercer experimento se evaluó la presencia del hongo en el suelo 8, 30, 70 y 95 días después de su inoculación, así como la patogenicidad de los aislamientos recuperados sobre huevos del nematodo. Las poblaciones disminuyeron a partir de la inoculación, registrándose valores mínimos hacia el final del experimento, mientras que la patogenicidad sobre el nematodo no mostró variación significativa, presentando en promedio, 72% de parasitismo de huevos.

Palabras Claves: *Paecilomyces lilacinus*, dosis, sobrevivencia, patogenicidad, control biológico, almácigos, café, *Coffea arabica*, *Meloidogyne* spp, nematodos.

ABSTRACT

Three experiments were carried out to evaluate the effect of *Paecilomyces lilacinus* on the coffee root knot nematode (*Meloidogyne* spp.). The first experiment estimated by probit analysis an LD50 of 25 g of rice colonized by *P. lilacinus* on a population of nematodes infective to coffee plants. The second experiment evaluated total and fractional doses of the fungus cultured on rice as compared to chemical treatment, under nursery conditions. One hundred days after transplanting, all treatments had significantly reduced the number of juveniles. Chemical treatment (fenamifos 1 g/bag, 10 days after transplanting) and the fungus dose of 50 g. (2.1 x 10⁹ spores/g of rice) showed the lowest level of nematode infection. Fractionated doses did not improve control. The third experiment evaluated the presence of the fungus in the soil 8, 30, 70, and 95 days after inoculation, and pathogenicity of the fungus recovered. Level of fungus was much reduced by the final evaluation though pathogenicity remained constant with a mean of 72% egg parasitism.

Keywords: *Paecilomyces lilacinus*, coffee nursery, *Meloidogyne* spp., survival, parasitism, biological control, probit test.

¹ Premio Nacional Gonzalo Ochoa 1996-1997 de la Asociación Colombiana de Fitopatología y Ciencias Afines ASCOLFI.

* Investigador COLCIENCIAS - Cenicafé.

** Investigador Principal I e Investigador Científico II. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Chinchiná, Caldas, Colombia.

Las especies del nematodo del nudo radical, *Meloidogyne javanica* y *M. incognita*, además de presentar una amplia distribución en zonas del trópico y subtropico y la mayor variedad de hospedantes económicamente importantes a escala mundial, están registradas como las más agresivas en el cultivo del café en Colombia, debido principalmente a los daños irreversibles causados al sistema radical de la planta, la alta capacidad reproductora que presentan y su amplia distribución en diversos agroecosistemas, lo cual ha exigido el desarrollo y evaluación de prácticas para su manejo y control (5, 11, 25, 26, 35).

Las investigaciones realizadas en el cultivo del café han demostrado la poca eficiencia de las medidas de control aplicadas en plantaciones establecidas con material de siembra parasitado por el nematodo. Bajo estas condiciones, los productos químicos de acción sistémica no son absorbidos ni translocados a través del sistema radical atrofiado por el nematodo y los nematicidas de contacto reducen, sólo provisionalmente, las poblaciones existentes en el suelo (5, 26).

Recientes experimentos demostraron que, cultivos de café establecidos con plantas obtenidas en vivero, libres del nematodo, no se ven afectadas en su crecimiento y producción al ser sembradas en campos altamente infestados por el complejo *M. javanica* y *M. incognita* (15, 25), por lo cual, se ha definido la etapa de almácigo como aquella donde se requiere la prevención y control del nematodo (4, 5, 15, 23, 26).

La agresividad, así como la importancia económica del daño de los nematodos, son razones para que las medidas de control utilizadas consulten el entorno donde van a actuar, buscando así conformar una propuesta de manejo integrado que involucre no sólo al parásito como tal, sino también sus relaciones con el ambiente y sus hospedantes y sirva de modelo para su consideración en otros cultivos donde

los nematodos revisten importancia económica (30).

El hongo *Paecilomyces lilacinus* fue registrado en el año de 1979 como un eficiente parásito de hembras y huevos del nematodo del nudo *Meloidogyne* spp. (24). A partir de entonces se han obtenido resultados promisorios para su desarrollo y utilización en programas de manejo del nematodo en el trópico y en zonas templadas (8,16, 28, 33). Muchos de estos experimentos han sido realizados en cultivos transitorios y son pocos los estudios en cultivos perennes como el café, en el cual se ha mencionado la posibilidad de introducir enemigos naturales para el control de nematodos desde 1950 (20). Pruebas realizadas recientemente en condiciones de laboratorio mostraron cómo el aislamiento 9201 del hongo *P. lilacinus* parasitó huevos del nematodo en más del 90%, resultado a raíz del cual, se sugirió la realización de estudios en almárgicos de café (12).

A pesar de los buenos resultados obtenidos en laboratorio y registrados en la literatura, las pruebas de campo muestran, en el comportamiento parasítico de *P. lilacinus*, la influencia de factores tales como: la patogenicidad de los aislamientos empleados, los substratos donde se incrementan, la interacción con otros microorganismos del suelo, la capacidad de colonizar el suelo y su persistencia en el mismo, las dosis que deben ser aplicadas, el número de aplicaciones necesarias y finalmente, el tipo de planta que se desea proteger.

Se desarrolló entonces esta investigación con el propósito de determinar el comportamiento parasítico del aislamiento 9201 de *P. lilacinus* en la etapa de almácigo del café y las posibilidades que ofrece para ser incorporado a una propuesta de manejo integrado del nematodo del nudo radical. En tres experimentos considerados, el primero buscó estimar mediante análisis "probit" la dosis media infectiva del hongo

P. lilacinus multiplicado en sustrato de arroz para controlar el complejo *M. incognita* y *M. javanica*; el segundo, probó en condiciones de almácigo de café el efecto que las dosis estimadas (aplicadas en forma total y fraccionada) tuvieron en el control del complejo del nematodo inoculado sobre plantas cotiledonares de café y el tercero, evaluó la permanencia en el suelo del hongo inoculado al almácigo de café y su capacidad parasítica sobre huevos del nematodo a través del tiempo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización. La investigación se realizó en la sede principal del Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé, Chinchiná. Las unidades experimentales se ubicaron en casa de mallas, en la cual se registró una temperatura máxima diurna de 28 °C, como mínima nocturna 15°C, una humedad relativa mínima diurna de 40% y la máxima nocturna de 100%.

Producción del inóculo del nematodo. El inóculo inicial se obtuvo de una población del complejo *M. javanica* y *M. incognita* aislada originalmente de raíces de café de un lote comercial de la finca "La Bamba", municipio de Santa Rosa de Cabal, Risaralda y conservada *in vivo* sobre raíces de tomate (*Lycopersicon sculentum* var. Santa Cruz) sembrado en suelo estéril (26).

El inóculo se incrementó sobre raíces de plantas de tomate *Lycopersicon sculentum* var. Santa Cruz, sembradas en suelo de la Unidad Chinchiná sin adiciones de materia orgánica y esterilizado en autoclave durante 30 minutos a 15 psi., y 121°C. Sesenta y cinco días después de la inoculación, las raíces presentaban abundantes nudosidades, suficientes para extraer de ellas los huevos de *Meloidogyne* spp. requeridos para los experimentos.

Inóculo de *P. lilacinus*. Se empleó el aislamiento 9201 obtenido por CORPOICA en Tibaitatá, a partir del insecto *Antiteuchus tripterus* (Hemiptero: Pentatomidae) y multiplicado y conservado en Cenicafé, en nevera, a 4°C y en sustrato de arroz cocido (12).

La capacidad parasítica del hongo se reactivó *in vitro* sobre huevos del complejo *M. incognita* y *M. javanica*. Con este propósito se depositaron 200 huevos/caja en una suspensión del hongo en agua destilada estéril, de concentración 5×10^7 esporas/ml, para determinar el porcentaje de parasitismo obtenido 8 días después. Posteriormente se extrajeron de las cajas, huevos parasitados del nematodo y se sembraron en medio PDA, para obtener de ellos colonias activas a partir de las cuales se multiplicó el hongo en arroz (12).

Los cultivos puros del hongo se incrementaron en arroz cocido; previo a esto, el arroz se lavó con agua de acueducto y se depositó en frascos de vidrio de boca ancha (100 g/frasco de 453ml); se adicionaron 100ml de agua de acueducto de pH 4,5 ajustado con una solución de ácido láctico. Posteriormente se taparon con papel de aluminio y se esterilizaron en autoclave a 15 psi. durante 30 minutos a 120°C (2).

Se tomó un segmento de 2cm² de un cultivo puro del hongo de 10 días de crecimiento y se inoculó el arroz preparado, manteniéndolo durante 7 días en la oscuridad, a 25°C, agitando diariamente los frascos. Los crecimientos obtenidos presentaron una producción promedio de 2×10^9 esporas/gramo de arroz.

Determinación de la Dosis Letal Media (DL₅₀) y DL₉₀ de *P. lilacinus* sobre huevos de *Meloidogyne* spp. Se evaluó el parasitismo de dosis crecientes de *P. lilacinus* multiplicado en arroz, sobre una cantidad constante de huevos del nematodo en suelo esterilizado.

Se empleó como sustrato, suelo de la unidad Chinchiná esterilizado en autoclave durante 30 minutos a 15 psi. y 121°C, el cual se depositó posteriormente en vasos plásticos desechables, de 300ml de capacidad (150g de suelo/ vaso). El hongo se multiplicó a partir de un cultivo puro y activo, obteniéndose una producción de $2,1 \times 10^9$ esporas/g, 10 días después de la siembra. La inoculación se realizó mezclando el hongo en las diferentes dosis con el suelo, 5 días antes de la inoculación de los nematodos y agregando posteriormente agua destilada estéril hasta conseguir capacidad de campo y así evitar la deshidratación del suelo durante el experimento.

El inóculo de *Meloidogyne* spp. lo constituyeron huevos del nematodo mezclados con 150g de suelo. Para la inoculación se hizo una suspensión en agua destilada estéril la cual se distribuyó uniformemente en el suelo. En trabajos realizados por Leguizamón (25) se determinó que 2500 huevos del nematodo producen una población inicial de J2 capaz de desarrollar una alta infección sobre plantas de café en estado cotiledonar, 100 días después de su inoculación.

Se realizó la extracción de los huevos del nematodo de las raíces de las plantas de tomate, mediante hipoclorito de sodio al 0,5%, Barker (6). El conteo se realizó con la ayuda de una cámara de recuento de células de 1ml de capacidad y cuadrícula de 20x50 cuadros, promediando los valores obtenidos en 6 recuentos sobre toda la cámara.

El diseño experimental utilizado fue completamente al azar con seis tratamientos y 20 repeticiones por tratamiento. La unidad experimental la conformó un vaso plástico que contenía el sustrato y los inóculos antes mencionados. En la Tabla 1 se describen los tratamientos evaluados.

TABLA 1. Dosis evaluadas del hongo *Paecilomyces lilacinus* y su equivalente por bolsa de almácigo de café.

Tratamiento	Peso de arroz colonizado por <i>Paecilomyces lilacinus</i> (g)	
	g/vaso*	Estimativo g/bolsa**
1	0,75	10
2	1,5	20
3	3	40
4	6	80
5	12	160

* Vaso plástico con un contenido de 150g de suelo estéril.

** Bolsa plástica de 17 x 23cm; 1650g de capacidad aproximadamente.

Se utilizó como variable, la cantidad de estadios J2 (juveniles móviles) recuperados de las muestras de suelo procesadas, ya que permite determinar el efecto del hongo no sólo en el parasitismo de huevos del nematodo, sino también en la posible inhibición de la movilidad de los J2 que logran eclosionar (13, 19). La movilidad de los estadios J2 es una característica de su capacidad de infección, por lo cual, se utilizó en este experimento una metodología donde fuera necesaria una buena movilidad de los estadios J2, para permitir su extracción.

La cantidad de J2 presentes en el suelo contenido en los vasos se midió 10 y 20 días después de la inoculación de los nematodos, (10 vasos/tiempo), siguiendo la metodología del "Tamiz plástico-Papel facial doble", modificado del método "Filtro de algodón" de Oostenbrink por Baeza *et al.* (4). En esta metodología, la muestra de suelo se deposita sobre un tamiz de cocina de 1mm de poro para ser lavada con agua de acueducto a presión y se recoge el material en un recipiente en el cual, luego de agitar repetidas veces, se vierte el material que sobrenada en un tamiz de 44µ. El material retenido en este tamiz se pasa a un tamiz plástico de 200 micras de poro cubierto

por una capa doble de papel facial y colocado sobre un plato plástico. El plato plástico contiene 250 ml. de agua que cubren totalmente al papel facial. Cuatro días después, la suspensión del plato se deposita en un recipiente y se completa hasta un volumen conocido, para realizar el recuento de los J2 presentes.

El porcentaje de mortalidad de nematodos para cada tratamiento, se estimó relacionando el número de J2 recuperados para cada repetición con los J2 del testigo (tratamiento no inoculado con el hongo); para este fin se empleó la fórmula:

$$\text{Mortalidad} = 100 \frac{\text{J2. Rept.} \times 100}{\text{J2. Test}} \llcorner 1 \gg$$

En donde:

J2. Rept. = Juveniles extraídos en la repetición R para el tratamiento T.

J2. Test = Promedio de Juveniles extraídos para el testigo.

Los porcentajes de mortalidad obtenidos para cada lectura se sometieron a análisis "probit", estimando la ecuación para el cálculo de la dosis media infectiva de inóculo de *P. lilacinus* expresado en gramos de arroz colonizado por el hongo.

Evaluación de dos dosis de *P. lilacinus* aplicadas en almácigos de café. Este experimento permitió evaluar dos dosis diferentes del hongo *P. lilacinus* aplicadas en forma total y fraccionada, en un almácigo de café var. Caturra para controlar *Meloidogyne* spp. Así mismo, comparó el control efectuado por el hongo con el de un nematicida comercial aplicado en una dosis recomendada para café.

El sustrato del ensayo se obtuvo de igual fuente y se sometió a igual tratamiento que el

empleado en el primer experimento. El hongo se incrementó en arroz según la descripción hecha para el experimento 1, con un recuento promedio de 2×10^9 esporas/g de arroz. El arroz se desmenuzó y se mezcló con el suelo; luego con esta mezcla se llenaron las bolsas del almácigo. El ensayo se ubicó en la casa de mallas donde se realizó el primer experimento.

Como fuente de inóculo del nematodo se emplearon 2500 huevos, los cuales se obtuvieron siguiendo la misma metodología que para la experimento 1 y se inocularon a las raíces de las plantas de café al momento del transplante (26).

Se aplicó el nematicida comercial fenamifos (Nemacur 10G. ^{MR.}) 10 días después del transplante de las plantas en estado cotiledonar en dosis de un gramo de producto comercial por bolsa (5).

Se empleó un diseño experimental completamente al azar, con siete tratamientos y 20 repeticiones por tratamiento. La unidad experimental la conformó una planta de café sembrada por bolsa de 17x23cm con capacidad de 1650 gramos de suelo, aproximadamente.

Tratamientos. Con base en los resultados obtenidos en el experimento 1 se seleccionaron para su evaluación, la DL_{50} estimada del hongo en sustrato de arroz, y el doble de esta dosis (Tabla 2).

Para los tratamientos donde se fraccionaron las dosis del hongo la mitad de ésta se aplicó 10 días antes del transplante (inoculación realizada según lo descrito anteriormente) y el resto, 30 días después del transplante, depositando superficialmente el hongo sobre la bolsa y cubriéndolo con una capa de suelo.

El experimento se calificó cien días después de la inoculación de los nematodos, midiendo

TABLA 2. Tratamientos utilizados para evaluar el control de *Meloidogyne* spp. con *Paecilomyces lilacinus*, evaluados bajo condiciones de almácigo en plántulas de café var. Caturra.

Tratamientos	Descripción
Testigo absoluto	Suelo estéril sin nematodos
Testigo con nematodos	Suelo estéril + inóculo de huevos de <i>Meloidogyne</i> spp.
Dosis 1	Suelo estéril + 25g del hongo + inóculo de <i>Meloidogyne</i> spp.
Dosis 1 fraccionada	Suelo estéril + 25g del hongo fraccionados + inóculo de <i>Meloidogyne</i> spp.
Dosis 2	Suelo estéril + 50g del hongo + inóculo de <i>Meloidogyne</i> spp.
Dosis 2 fraccionada	Suelo estéril + 50g del hongo fraccionados + inóculo de <i>Meloidogyne</i> spp.
Tratamiento químico	Suelo estéril + inóculo de <i>Meloidogyne</i> spp. + nematicida químico

el peso fresco de cada una de las raíces de las plantas de café, así como la infección causada por el nematodo a la raíz de cada una de las plantas. La infección se cuantificó visualmente en porcentaje de raíces con nudosidades, mediante escala de calificación propuesta por la Universidad de Carolina del Norte (USA) en el proyecto internacional de *Meloidogyne*, modificada por Leguizamón (25) (Tabla 3.). Los valores obtenidos para el peso fresco de raíces así como para el grado de infección, se sometieron a un análisis de varianza y prueba de comparación de Tukey (5%). Las plantas se agruparon por grado de infección para cada

tratamiento y las raíces de los diferentes grupos formados, se dividieron en pequeños trozos y se distribuyeron en porciones de un gramo, que se depositaron individualmente en frascos de vidrio. De cada gramo de raíces se extrajeron los huevos, juveniles (J2) y hembras presentes, analizando el total del sistema radical de cada una de las repeticiones para cada tratamiento.

La extracción de los estados se logró mediante degradación enzimática de la pared celular del tejido de las raíces por acción de las enzimas Pectinasa^{MR} (Sigma) y Celulasa^{MR}

TABLA 3. Escala de calificación modificada para la infección de *Meloidogyne* spp. sobre plantas de café (25).

Grado	Descripción
Grado 1	Ausencia de daño
Grado 2	Con una nudosidad y hasta el 10% de las raíces laterales afectadas. Sin daño en cuello o raíz pivotante
Grado 3	Entre el 11% y el 25% de las raíces laterales con nudosidades. Cuello y raíz pivotante sin daño.
Grado 4	Entre el 26% y el 50% de las raíces laterales con nudosidades. Ataque en la raíz pivotante, cuello sin daño, presencia ocasional de masas de huevos.
Grado 5	Entre el 51% y el 75% de las raíces laterales con nudosidades. Ataque en la raíz pivotante, menos del 50% del perímetro del cuello afectado, presencia de masas de huevos externas.
Grado 6	Mas del 76% de las raíces laterales con nudosidades. Ataque en la raíz pivotante, más del 50% del perímetro del cuello afectado (tejido suberizado), presencia de masas de huevos externas.

(Sigma)(18). Las raíces sumergidas en las enzimas se incubaron a 30°C durante 72 horas, al cabo de las cuales se disecaron los nudos con bisturí y una aguja de acero y se extrajeron los diferentes estados del nematodo. Se lavaron extrayéndolos de la suspensión de enzimas y se concentraron en una suspensión acuosa para su recuento con una cámara de 1ml de capacidad y cuadrícula dividida en 1000 celdas, contando sobre todos los cuadros en tres montajes sucesivos el número de huevos, J2 y hembras presentes. Se calcularon los promedios de los valores de las tres lecturas y con éstos se estimó el número de estados por gramo de raíz. Se sometieron los promedios al análisis de varianza y la prueba de Tukey al 5%.

Persistencia de *Paecilomyces lilacinus* en el suelo y capacidad parasítica sobre huevos del nematodo. Para evaluar la persistencia se tomaron muestras de suelo de 50g de una bolsa elegida al azar para ambos tratamientos, en la cual el hongo se aplicó en dosis total. La evaluación se realizó a los 8, 30, 70 y 95 días después de la inoculación del hongo. Con el suelo se prepararon soluciones diluyendo hasta una concentración 1 en 2000 en agua destilada estéril (16). Se inocularon alícuotas de 0,5ml de las soluciones superficialmente en cajas petri con PDA acidificado (20 cajas por muestra).

Se hizo un recuento de UFC del hongo en las cajas sembradas, 15 días después de la inoculación, y se estimó el número de éstas por gramo de suelo. Posteriormente se transformaron los valores observados para cada tiempo de evaluación, logarítmicamente, y se sometieron a análisis de regresión para cada tratamiento.

Patogenicidad de *P. lilacinus*. Ésta se evaluó a los 0, 30, 60, 90 días después de inoculado el hongo en el suelo. Las colonias se purificaron y se incrementaron en arroz y se realizaron las pruebas de parasitismo de los crecimientos obtenidos en la prueba de permanencia del

hongo para cada tiempo de muestreo. Los aislamientos obtenidos se incrementaron en arroz y se prepararon suspensiones en agua destilada estéril, siguiendo la metodología descrita. Los huevos del nematodo se obtuvieron de igual fuente y con la metodología anterior.

En cajas de petri esterilizadas y dispuestas al azar (20 cajas por cada aislamiento), se pusieron en contacto 200 huevos del nematodo por cada caja, con una concentración 5×10^7 esporas/ml del hongo en un volumen de 4ml (12, 14). Ocho días después se realizó el recuento de los huevos que no mostraban signos de parasitismo, tiñendo para este fin el volumen de las cajas con 0,3 ml. de azul de lactofenol. Con estos valores se estimaron los porcentajes de parasitismo del hongo para cada tiempo de evaluación sometidos al análisis de varianza y la prueba de Tukey (5%).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de la dosis letal media (DL_{50}) de inóculo de *Paecilomyces lilacinus* sobre huevos de *Meloidogyne* spp. Evaluación 10 días después de inoculados los huevos de *Meloidogyne* spp., al suelo. Se observó disminución progresiva y altamente significativa del número de estadios juveniles recuperados a medida que la dosis del hongo fue mayor y por tanto, una relación directa entre la dosis y la mortalidad del nematodo, (Tabla 4).

El análisis de varianza de los registros mostró estimaciones altamente significativas para los parámetros, permitiendo conformar con ellos una ecuación confiable para el cálculo de la DL_{50} . La ecuación estimada para el cálculo de la dosis letal media de inóculo de *P. lilacinus* sobre un inóculo de 2500 huevos de *Meloidogyne* spp. fue la siguiente:

$$Y = 4,244310 + 0,626974(X+1^*) \quad \ll 2 \gg$$

Los valores calculados con esta ecuación para la dosis media infectiva (DL_{50}) y la dosis letal 90 (DL_{90}) fueron los siguientes:

$$\begin{aligned} \text{Dosis letal media (DL}_{50} = X): & 5=4,244310 \\ & + 0,626974(X+1) \quad \ll<3>> \\ & X_{50} = 2,33\text{g} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Dosis letal 90 (DL}_{90} = X): & 5 + 1,28 = \\ & 4,244310 + 0,626974(X+1*) \quad \ll<4>> \\ & X_{90} = 24,7\text{g} \end{aligned}$$

Donde:

Y = Valor probit

X = Logaritmo natural de la dosis

* = Este valor fue adicionado al análisis ya que fueron evaluadas dosis <1 y su logaritmo es un valor negativo.

1,28 = Valor de la distribución normal para el 90%.

Los valores se obtuvieron para 150g de suelo inoculado; las dosis correspondientes para 1650g de suelo de una bolsa de almácigo normal fueron las siguientes:

DL_{50} = 25,6g de arroz colonizado por el hongo/bolsa de almácigo.

DL_{90} = 271,g de arroz colonizado por el hongo/bolsa de almácigo.

Ambas dosis coinciden con las señaladas por otros autores como efectivas para el control de *Meloidogyne* spp. (3, 24, 29, 33). Cardona (12), señaló un potencial parasítico para el aislamiento 9201 del 94% bajo condiciones *in vitro*; sin embargo, en este experimento se observó que la dosis del hongo necesaria para producir un control del 90% (DL_{90}) sobre un inóculo de 2500 huevos del nematodo por bolsa de almácigo resulta ser bastante alta y conlleva, bajo condiciones de agricultor, a la manipulación de altos volúmenes de arroz y prácticas de producción del hongo que incrementarían los costos del almácigo. Considerando que una aplicación generalizada de un control que busca realizar una acción protectora de las plantas del almácigo deberá ser efectiva con bajos costos, el empleo de una dosis como la DL_{90} estimada en este experimento resulta ser costosa, por lo cual deberán explorarse alternativas de aplicación que permitan ubicar en el suelo gran cantidad de esporas a bajo costo.

TABLA 4. Promedio de estados juveniles (J2) de *Meloidogyne* spp. recuperados, y mortalidad calculada respecto del testigo, para las evaluaciones realizadas 10 y 20 días después de inoculados los nematodos en el suelo.

DOSIS*	10 días			20 días		
	n	J2 recuperados	%Mortalidad	n	J2 recuperados	%Mortalidad
0	10	737,6	0	10	111,25	0
0,75	7	503	31,7	4	85	23,59
1,5	5	391	47,0	4	61,75	44,58
3	10	294	60,0	7	50,85	54,41
6	-	-	-	4	57,5	48,31
12	9	162	75,5	2	60	46,07

* Dosis del hongo *P. lilacinus* expresadas en gramos de arroz colonizado por 150g de suelo.

Una práctica recomendada a los caficultores en la elaboración de sus almácigos de café consiste en la mezcla del suelo del almácigo con materia orgánica descompuesta con el fin de mejorar las características químicas y físicas del suelo. La multiplicación del hongo en substratos que puedan ser empleados como materia orgánica para las plantas, deberá ser evaluada como una alternativa para la aplicación de dosis altas del hongo, sin necesidad de incrementar el número de labores a realizar y sin afectar en forma considerable los costos de producción del almácigo. Al respecto, se realizaron algunos estudios empleando para la multiplicación del hongo materiales de desecho y estiércol de gallina, encontrándose un control favorable del nematodo *Meloidogyne* spp. (1, 27).

Dadas las limitaciones que por ahora presenta el empleo de dosis altas, en el segundo experimento de ésta investigación, se evaluó el efecto de dosis estimadas inferiores a la DL_{90} sobre el control del nematodo. Una dosis inferior a la DL_{90} resulta económicamente aceptable según lo planteado por Backman y Rodríguez (3), quienes mencionan que por razones como los costos de producción y volúmenes de almacenamiento, se debe evitar el uso de aplicaciones de agentes de biocontrol superiores a 100 - 200 kg/ha. Sin embargo, la reducción de la dosis podría comprometer la efectividad biológica del control al producirse una infección del nematodo incorregible posteriormente, lo cual refuerza la necesidad de investigar estrategias complementarias que incrementen la eficiencia del control biológico, dentro del marco del manejo integrado del nematodo.

Evaluación realizada 20 días después de inoculados los huevos de *Meloidogyne* al suelo. El análisis de varianza para la segunda evaluación no mostró diferencia significativa entre tratamientos, por lo cual los parámetros evaluados no permiten conformar una ecuación para la realización de estimaciones confiables.

En esta evaluación y con respecto a la primera lectura se observó una disminución en el número de unidades experimentales con presencia de J2, así como una reducción en el número de J2 totales por unidad experimental. Esta baja recuperación puede ser explicada por la pérdida de movilidad que presentan los J2 de *Meloidogyne* spp., a través del tiempo, influenciada por factores tales como: temperatura alta, pérdida de humedad del substrato, ausencia de material vegetal susceptible de ser infectado o presencia de compuestos orgánicos e inorgánicos en el medio.

La ausencia de raíces susceptibles de ser parasitadas tiene gran influencia en la movilidad de los nematodos a largo plazo, ya que estos responden favorablemente a los estímulos químicos provenientes de las raíces de la planta. Ante la ausencia de tales estímulos, la movilidad del nematodo cesa al cabo de pocos días como medida defensiva para conservar sus pocas reservas ya que, en ésta etapa de su desarrollo, el nematodo no tiene actividad alimenticia (21).

Evaluación de dosis totales y fraccionadas en plántulas de café var. Caturra. Peso fresco de raíces. El nematodo inoculado indujo reducción significativa del peso fresco total de las raíces de las plantas de café para todos los tratamientos evaluados (Tabla 5). El hongo tuvo un comportamiento similar al del tratamiento químico con el cual no presentó diferencias estadísticas, así mismo, ninguno de los tratamientos donde se aplicó el hongo presentó diferencias estadísticas para esta variable, con el testigo inoculado.

Grado de infección. El hongo aplicado en dosis de 50 g/bolsa (total y fraccionada) y el tratamiento químico, fueron los mejores tratamientos ya que lograron reducir significativamente el grado de infección radical causado por el nematodo en plántulas de café, comparados con el testigo inoculado. El tratamiento

consistente en la aplicación de 25g del hongo (dosis total y fraccionada) no mostró diferencias estadísticas con el testigo inoculado.

En este experimento todos los tratamientos probados presentaron un grado de infección cercano o superior a 4, explicado por la infección causada en las raíces de café por la población inicial del nematodo (población inoculada) y al incremento de la población a través del tiempo. La aplicación dirigida del inóculo del nematodo sobre las raíces de la planta fue una condición altamente favorable para la infección y por esto, exigente para que el hongo ejerciera el control. Cano y Gil (11), demostraron cómo 600 estadios juveniles de *Meloidogyne* spp. ubicados en la zona de raíces de la planta de café, es cantidad suficiente para generar una infección de grado 6, tres meses después de ser inoculados. Según lo observado en el anterior experimento, de los 2500 huevos del nematodo inoculados es posible recuperar en promedio una población de juveniles infecciosos de *Meloidogyne* spp. (Tabla 5.), en cantidad mayor a la sugerida por Cano y Gil (11) como alta.

No obstante, el mejor tratamiento mostró, en promedio, un grado de infección de 3,94. Este valor resultó 1,4 grados por debajo de la infección mostrada por el testigo que según la escala de calificación utilizada corresponde a un incremento en las raíces secundarias sanas superior al 25%, ausencia de daño a nivel del cuello de la planta y presencia ocasional de masas de huevos. Esto sugiere la notable acción del hongo en el control de los incrementos de población del nematodo, estadísticamente similar a la observada para el control químico, tratamiento que mostró menor grado de infección. Estos resultados coinciden con los de Cabanillas y Barker (7), quienes lograron reducir en un 25% el porcentaje de nudosidades en plantas de tomate de mesa con aplicaciones del hongo, empleando granos de trigo como sustrato.

La aplicación fraccionada de las dosis del hongo no ofreció protección adicional a la planta, ya que el hongo no presentó un adecuado contacto con el sistema radical de la planta, debido a que la inoculación se realizó en forma superficial. Al respecto, una aplicación del

TABLA 5. Grado de infección en valores de la escala++ y peso fresco de raíces de café (g), para los diferentes tratamientos 100 días después de la inoculación de *Meloidogyne* spp.

Tratamiento	n	Peso fresco (g)+	Grado de infección ++
Testigo no inoculado	20	0,955 a*	
Testigo inoculado	11	0,660 b	5,37 a*
Dosis 1	14	0,680 b	5,25 a
Dosis 1 Fraccionada	11	0,594 b	5,0 ab
Dosis 2 Fraccionada	12	0,671 b	4,31 bc
Dosis 2	10	0,536 b	3,94 c
Químico	12	0,611 b	3,90 c
C.V.		22,12	18,92

*Valores con igual letra no presentan diferencias estadísticas. Tukey al 5%.

+ Peso fresco de raíces expresado en gramos

++ Ver Tabla 2

hongo en suspensión acuosa puede ofrecer mejores posibilidades para un almácigo de café ya establecido (28).

Número de huevos, estadios juveniles y hembras. Los análisis de varianza para las variables número de huevos y número de J2 mostraron diferencias altamente significativas entre tratamientos. El número de hembras no presentó diferencias entre tratamientos (Tabla 6.).

Con la aplicación de 50g/planta hubo reducción del 64% del número de huevos del nematodo respecto al testigo. El hongo actuó como ovicida lo cual ha sido registrado por varios autores en investigaciones anteriores (7, 8, 9, 12, 19, 24, 32). Este tratamiento no mostró diferencias estadísticas con el tratamiento químico el cual causó reducción en la presencia de huevos del 70%, respecto al testigo inoculado. Debido a que el nematodo oviposita en forma de masas al interior de una matriz gelatinosa, el parasitismo del hongo sobre los huevos más externos se dificulta, quedando aquellos más internos protegidos (33).

Así mismo, la gran capacidad reproductora del nematodo y la susceptibilidad de hospedantes

como el café induce a que, aún bajo condiciones de alto parasitismo por parte del biocontrolador, existan huevos no parasitados que proporcionan un número de J2 suficientes para causar infección. Una hembra del nematodo produce cerca de 500 huevos durante su fase reproductora y con un factor de sobrevivencia de sólo un 2,5% bastan tres ciclos para que el número de huevos sea de 976.500 (31), lo cual, en el caso de *M. incognita*, puede ocurrir a los 150 días (35).

El número de hembras no presentó diferencias estadísticas entre tratamientos, ya que la forma dirigida como fueron inoculados los nematodos, permitió una rápida infección y establecimiento en las raíces, ofreciéndole al hongo reducida acción sobre la población inicial del nematodo.

El análisis del número de J2 recuperados mostró el efecto del hongo sobre el incremento de población del nematodo. Todos los tratamientos redujeron el número de J2 en las raíces, mostrando todos diferencia respecto al testigo no tratado. Así mismo, los tratamientos con el hongo redujeron entre un 32% y un 52% el número de J2 correspondiendo los valores más

TABLA 6. Número de huevos, estados juveniles (J2) y hembras de *Meloidogyne* spp. por gramo de raíces de café para los diferentes tratamientos, 100 días después de la inoculación.

Tratamiento	n	No. hembras	No. Juveniles (J2)	No. Huevos
Testigo inoculado	11	31,00 a*	1060 a*	510 a*
Dosis 1	14	26,36 a	677 b	613 a
Dosis 1 Fraccionada	11	37,82 a	720 b	446 a
Dosis 2 Fraccionada	12	46,75 a	655 b	512 a
Dosis 2	10	24,4 a	513 b	102 b
Químico	12	18,25 a	560 b	156 b
C.V.		99,69	39,38	44,51

* Valores con igual letra no presentan diferencias estadísticas. Tukey al 5%.

altos a los tratamientos donde el hongo se aplicó en la mayor dosis (Tabla 7.).

El mayor control conseguido al incrementar la dosis del hongo es similar a lo observado en el primer experimento de esta investigación y a lo registrado por otros autores en investigaciones anteriores (7, 32). Sin embargo, como ya fue señalado en el primer experimento, aumentar la dosis puede resultar poco económico y práctico, lo que obligaría a la búsqueda de medidas complementarias de control.

El mejoramiento de la formulación del hongo permitirá que el potencial de control de los diferentes aislamientos sea aprovechado al máximo; así mismo, la búsqueda y selección de nuevos aislamientos y el mayor conocimiento básico que pueda obtenerse sobre la ecología y el comportamiento de los organismos bajo condiciones de suelo, permitirán la introducción de este hongo en los programas de manejo integrado de *Meloidogyne* spp. La evaluación y utilización de diferentes microorganismos del suelo que ejercen parasitismo sobre los diferentes estados del nematodo, (como es el caso de la bacteria *Pasteuria penetrans*) y de microorganismos simbioses de las plantas (micorrizas), permitirán disponer de numerosas herramientas microbiológicas para el control integral de todos los estados del nematodo y sus mecanismos de acción (12, 24).

Evaluación de la persistencia y patogenicidad de *Paecilomyces lilacinus* en el suelo. Determinación de la persistencia. En éste experimento se observó cómo *P. lilacinus*, aislamiento 9201, reduce de forma altamente significativa su persistencia en el suelo a unas altas tasas diarias (superiores a 90000 UFC/g de suelo/día), a partir del momento de su inoculación en el almácigo (Figura 1). Esto implica que la planta pueda quedar desprotegida contra la infección del nematodo poco tiempo después de la aplicación del hongo, ya que, a pesar de que las poblaciones del nematodo se redujeron a causa de las medidas de control aplicadas, en un corto período podrá incrementarlas a niveles tan altos como los existentes en ausencia de medidas de control.

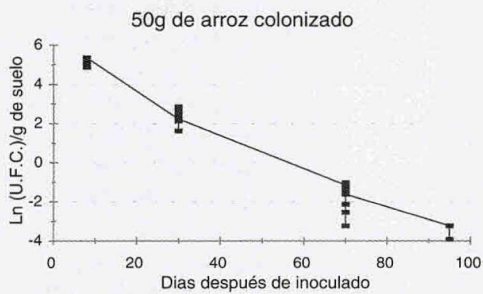
Esta situación es particularmente preocupante cuando el hongo se utiliza para la protección de cultivos susceptibles de ciclo corto, tales como, tabaco, tomate, estropajo y hortalizas, entre otros, puesto que la protección inicial no es suficiente para prevenir una infección alta de la planta en fases posteriores del desarrollo, donde se ve comprometida directamente la producción y los segundos ciclos de cultivo.

En un experimento realizado en estropajo (*Luffa cylindrica*) se observó cómo el aislamiento 9201 de *P. lilacinus* ofrece un control de las poblaciones iniciales de *Meloidogyne* spp.,

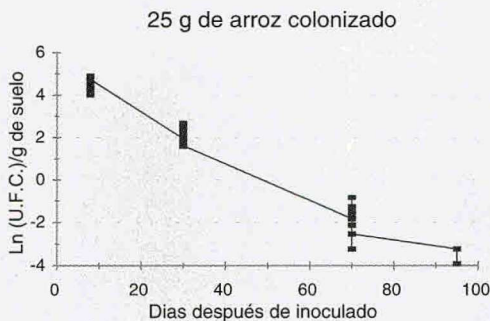
TABLA 7. Reducción porcentual, respecto al testigo, del número de juveniles (J2) y huevos de *Meloidogyne* spp/g de raíces de café, para cada uno de los tratamientos evaluados.

TRATAMIENTOS	n	J2/g	% de reducción	Huevos/g	% de reducción
Testigo	11	1060	0 a*	610	0 a*
25F	11	720	32 b	613	0 a
25T	14	677	36,1 b	446	26 a
50F	12	655	38,2 b	512	16 a
Químico	12	569	46,3 b	102	83 a
50T	10	513	51,6 b	156	74 a

* Valores con igual letra no presentaron diferencias estadísticas. Tukey al 5%



* Los valores están expresados en unidades de mil (1×10^3)
 Ecuación de regresión estimada*
 $Y = 5.79 - 0.1X$. $r^2 = 0.98$



* Los valores están expresados en unidades de mil (1×10^3)
 Ecuación de regresión estimada*
 $Y = 4,591 - 0,092X$ $r^2 = 0,972$.

Figura 1. Comportamiento a través del tiempo del logaritmo natural del número de unidades formadoras de colonia del hongo (UFC/g de suelo), recuperadas del suelo del almácigo desde su inoculación y hasta los 95 días, para los tratamientos 25 y 50 gramos de arroz colonizado por el hongo *P. lilacinus* aplicado en un almácigo.

a pesar de la alta susceptibilidad que presenta la planta a este nematodo. Sin embargo, por tratarse de una planta de producción temprana y ciclo bi-anual, la aplicación del hongo en la etapa inicial del cultivo no evitará daños posteriores y se requiere la adopción de medidas complementarias enmarcadas en el contexto de un programa de manejo integrado del nematodo,

que permitan una protección más duradera a la planta (17).

En la etapa de almácigo el sistema radical del cafeto es particularmente susceptible y en cortos períodos, tres a cuatro meses, la infección del nematodo genera grados máximos de daño con consecuencias irreversibles para el cultivo. Sin embargo, cuando una planta sana supera esta etapa, el inóculo natural del nematodo presente en el suelo no afecta la productividad final del cultivo (26).

En los procesos de recuperación del hongo del suelo se observó una gran diversidad de organismos en las cajas inoculadas con las suspensiones de suelo del almácigo, muchos de los cuales presentaban mayor proliferación y desarrollo frente a las colonias de *P. lilacinus*. Esto sugiere, que bajo condiciones de almácigo, el aislamiento 9201 de *P. lilacinus* tuvo un comportamiento poco competitivo frente a los organismos presentes, lo cual contribuyó a la pérdida de persistencia, a pesar de ser inoculado bajo condiciones favorables (dosis altas y suelo esterilizado).

Patogenicidad de los aislamientos recuperados del suelo. A los 8, 30 y 75 días después de inoculado en pruebas *in vitro* sobre huevos de *Meloidogyne* spp. Cardona (12) encontró parasitismo de *P. lilacinus* 9201 superior al 90%; sin embargo, en el presente experimento después de un prolongado almacenamiento del hongo una vez realizada su reactivación e incremento en arroz, el parasitismo fue del 73,2%, el cual no presentó variaciones significativas para los diferentes tiempos de evaluación después de la inoculación al almácigo (Tabla 8.). El alto grado de contaminación que presentaron las cajas con otros microorganismos presentes en las muestras de suelo, 95 días después de la inoculación del hongo al almácigo, impidió la purificación de los aislamientos del hongo recuperados para esta evaluación.

TABLA 8. Parasitismo *in vitro* de huevos de *Meloidogyne* spp., causado por aislamientos de *P. lilacinus* recuperados 0, 30 y 75 días después ser inoculados al suelo del almácigo.

Días de evaluación	n	Porcentaje de Parasitismo
0	4	73,2 a*
30	42	77,5 a
75	43	77,9 a
C.V.	6,4	

* Valores con igual letra no presentaron diferencias estadísticas. Tukey al 5%.

El hongo *P. lilacinus* puede realizar su acción parasítica sobre los huevos del nematodo *Meloidogyne* spp. debido a complejos procesos bioquímicos de reconocimiento y síntesis de las enzimas quitinasas y proteasas, que le permiten degradar el recubrimiento exterior de los huevos y producir su colonización (33). Estos mecanismos bioquímicos son codificados en el genoma del hongo para expresarse posteriormente en alguna etapa de su desarrollo determinando así la especificidad y complejidad que muestra al momento de seleccionar su hospedante (Figura 2.).



Figura 2. a. Estructuras de *Paecilomyces lilacinus* 9201 al microscopio óptico de luz a 40x ; b. Conidióforo al microscopio electrónico de barrido a 3600x.; c. Parasitismo de *P. lilacinus* sobre huevos de *Meloidogyne* spp. observado en pruebas de patogenicidad *in vitro*. d. *P. lilacinus* 9201 cultivado en arroz y en medio sintético.

No obstante lo anterior, el parasitismo no siempre ocurre. En un estudio de caracterización por isoenzimas en el que se evaluaron 10 aislamientos diferentes de *P. fumosorosus* y 14 aislamientos de *P. lilacinus*, a pesar de la homogeneidad observada entre los aislamientos del grupo de *P. lilacinus*, sólo uno de los aislamientos mostró un alto parasitismo de los huevos de *M. javanica*, y no se observó correlación entre virulencia y los grupos obtenidos por el análisis cluster de isoenzimas (34). Esto señala la existencia de otros factores además del genético, vinculados en el proceso parasítico del hongo bajo condiciones de campo, que determinan el éxito de las aplicaciones. Se señalan como causas de resultados contradictorios los procesos de mutación y/o adaptación obtenidos cuando el hongo es introducido en áreas geográficas diferentes a las de su aislamiento, donde los factores ambientales pueden afectar la expresión de los mecanismos de virulencia (10). Así mismo, se ha señalado la influencia que tiene el suelo y el tipo de planta sobre el control del nematodo, ya que el hongo puede no colonizar el suelo donde fue inoculado, a pesar de sobrevivir en él durante varios años (22).

Lo anterior, sugiere la necesidad de disponer de una amplia base genética del hongo que al ser evaluada, permita obtener un mejor conocimiento de su comportamiento del hongo bajo condiciones de almácigo y la influencia que tienen los diversos factores ambientales en el control que ejerce del nematodo.

Es muy importante señalar que una estrategia desarrollada para el manejo integrado de *Meloidogyne* spp., debe tener en cuenta las diversas medidas de control para complementar las prácticas de manejo armónicamente, buscando expresar el poder de control que cada una presenta. Los mecanismos de resistencia de los cultivos al ataque del nematodo, tales como el tipo de crecimiento, la fenología y la producción de compuestos químicos, harán que

la protección que el hongo realiza a largo plazo tenga mayor o menor importancia dentro del conjunto general de prácticas de manejo integrado.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología "Francisco José de Caldas". COLCIENCIAS.

LITERATURA CITADA

1. AL RADDAD, A.M. Interactions of *Glomus mosseae* and *Paecilomyces lilacinus* on control of *Meloidogyne* spp. on tomato. *Mycorrhiza* 5: 233.-236.1995.
2. ANTIA L., O. P.; POSADA F., F.S.; BUSTILLO P., A.E.; GONZALEZ G., M.T. Producción en la finca del hongo *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café. *Avances Técnicos Cenicafé* N°. 182: 1-12.1992.
3. BACKMAN, P.A.; RODRIGUEZ K., R.A. A system for the growth and delivery of the biological control agents to the soil. *Phytopathology* 65: 819-821.1975.
4. BAEZA, C.; LEGUIZAMON C., J.E. Evaluación de cuatro métodos para la extracción de formas activas de nematodos del suelo. *Cenicafé* 24(4):90-99.1973.
5. BAEZA, C.; LEGUIZAMON C., J.E. Evaluación de nematicidas para el control de *Meloidogyne exigua* en plantas de café var. Caturra. *Cenicafé* 28(3):108-116.1977.
6. BARKER, K. R. Nematode extraction and bioassays *In*: BARKER, K.R.; CARTER, C.C.; SASSER, J.N. An advance treatise of *Meloidogyne*. Vol. 2. Raleigh, North Carolina University, 1985. p.19-35.
7. CABANILLAS, E.; BARKER, K. R. Inoculum level and application time of *Paecilomyces lilacinus* on control of *Meloidogyne incognita* in Tomato. *Journal of Nematology* 21(1): 115-120. 1989.

8. CABANILLAS, E.; BARKER, K. R. Histology of the interactions of *Paecilomyces lilacinus* with *Meloidogyne incognita* on tomato. *Journal of Nematology* 20 (3):362-365. 1988.
9. CABANILLAS, E.; BARKER, K. R.; NELSON, L.A. Survival of *Paecilomyces lilacinus* in selected carriers and related effects on *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology* 21(1):121-130. 1989.
10. CABANILLAS, E.; BARKER, K. R.; NELSON, L.A. Growth of isolates of *Paecilomyces lilacinus* and their efficacy in biocontrol of *Meloidogyne incognita* on tomato. *Journal of Nematology* 21 (2):164-172. 1989.
11. CANO J., A.; GIL V., L.F. Dinámica de poblaciones de *Meloidogyne incognita* a diferentes densidades en café var. Caturra en vivero. Manizales, Universidad de Caldas. Facultad de Agronomía, 1980. 120 p. (Tesis: Ingeniero Agrónomo).
12. CARDONA, N.L. Informe anual de actividades. *Disciplina de Fitopatología* 1993 - 1994. Chinchiná, Cenicafé. 1994. p.v.
13. CARRERAS S., B. Sustancia nematocida aislada de cultivos filtrados de *P. lilacinus*. In: FORUM Ciencia y Técnica INISAV, 9.; Encuentro Nacional de Bioplaguicidas, 2.; EXPOCREE, II. La Habana, 25-27 de Octubre de 1994. Resúmenes. La Habana, Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal, 1994. p.28.
14. FERNANDEZ, E. Efectividad in vitro del hongo *Paecilomyces lilacinus* como control biológico de *Meloidogyne incognita*. *Revista de Protección Vegetal* 4(1): 66. 1991.
15. FIGUEROA M., A. Reconocimiento de nematodos en almácigos de café. *Investigaciones Agrícolas* 3(1): 26-29. 1989.
16. GASPARD, J.T.; JAFFEE, B.A.; FERRIS, H. Association of *Verticillium* sp. and *Paecilomyces lilacinus* with root knot nematode in soil infested. *Journal of Nematology* 22(2): 208. 1990.
17. GIRALDO F., M.A.; LEGUIZAMON C., J.E.; CHAVES, B. Efecto de *Paecilomyces lilacinus* en el control de *Meloidogyne* spp. en plantas de estropajo (*Luffa cylindrica* L.). *Fitopatología Colombiana* 20 (1-2): 20-25. 1996.
18. GODOY, G.; RODRIGUEZ K., R. An enzymatic technique for obtaining females for biological control studies. *Nematropica* 13 (1):75-78. 1983.
19. GOMEZ, E.; ALVAREZ, R.M. Estudio preliminar sobre la producción de toxinas por el hongo *P. lilacinus*. In: FORUM Ciencia y Técnica INISAV, 9.; Encuentro Nacional de Bioplaguicidas, 2.; EXPOCREE, II. La Habana, 25-27 de Octubre de 1994. Resúmenes. La Habana, Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal, 1994. p.23.
20. GONZALEZ M., R. Nematodos. *Cenicafé* 1(6): 24-27. 1950.
21. GUNDY, S.D. VAN. Agalling and starvation in larvae of *M. incognita* and *Tylenchulus semipenetrans*. *Phytopathology* 57: 559-571. 1967.
22. HEWLETT, T.E.; DICKSON, D.W.; MITCHELL, D.J. Evaluation of *P. lilacinus* as a biocontrol agent of *M. javanica* on tobacco. *Journal of Nematology* 20(4): 578-584. 1988.
23. JAEHN, A. Viabilidad do uso de nematocidas en cafezal novo em solo infestado por *Meloidogyne incognita*. *Nematologia Brasileira* 8: 275-283. 1984.
24. JATALA, N. Biological control of plant parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology* 24: 453-489. 1986
25. LEGUIZAMON, J.E. Efecto de *Meloidogyne* spp. en plantaciones establecidas de café var. caturra. In: CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES DE CAFE. Informe anual de actividades *Disciplina Fitopatología* 1991-1992. Chinchiná, Cenicafé, 1991. p.v.
26. LEGUIZAMON, J.E. Efecto de *Meloidogyne* spp. en plantaciones establecidas de café var. Caturra. In: CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES DE CAFE. Informe anual de actividades *Disciplina Fitopatología* 1993-1994. Chinchiná, Cenicafé, 1994. p.v.
27. LICOR M., L. Alternativas regionales para la producción de microorganismos entomógenos. In: FORUM Ciencia y Técnica INISAV, 9.; Encuentro nacional de Bioplaguicidas, 2.; EXPOCREE, II. La Habana, 25-27 de Octubre de 1994. Resúmenes. La Habana, Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal, 1994. p.67.

28. MOLINA B., L. A. Manejo de *Meloidogyne incognita* en el cultivo del lulo (*Solanum quitoense*) en el municipio de San Lorenzo. Ciencias Agrícolas 11: 77-90. 1989-1992.
29. RODRIGUEZ K., R.; MORGAN J., G. Potential for nematode control by mycofloras endemic in the tropics. Journal of Nematology 20 (2):191-203. 1988.
30. SAYRE, R.M. Influencial factors on biological control of plant parasitic nematodes. Annual Review of Phytopathology, 29:149-166. 1991.
31. SASSER, J.N.; TAYLOR, A.L. Biology identification and control of root knot nematode. Raleigh. North Carolina State University, 1978. p.103.
32. SHARMA, J.L.; TRIVENDI, P.C.; SHARMA, M.K.; TIAGI, B. Control of nematode *Meloidogyne incognita* using fungus *Paecilomyces lilacinus*. Annals of Biology, 5(2): 103-107. 1989.
33. STIRLING, G.R. Biological control of plant parasitic nematodes. Wallingford, C.A.B. International, 1991. p 227.
34. TIGANO-MILANI, M.S.; CARNEIRO, R.G.; DEFAIRA, M.R.; FRAZAO, H.S.; MACOY, C.W. Isozyme characterization and pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* and *P. lilacinus* to *Diabrotia speciosa* and *Meloidogyne javanica*. Biological Control 5 (3): 378-382. 1995.
35. VILLALBA G.,D. Ciclo de vida de *Meloidogyne incognita* raza 5, en café var. Caturra. Bogotá, Universidad Nacional. Facultad de Agronomía, 1980. 86p. (Tesis: M.Sc.).