

Efecto *in vitro* de VersaKlin® sobre *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood y detección de enzimas hidrolíticas

In vitro effect of VersaKlin® against *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood and screening of hydrolytic enzymes

Amaia Ponce de la Cal^{1*}, María Elena Márquez Gutiérrez^{2a}, Emilio Fernández González¹, Marusia Stefanova Nalimova¹, Enrique Ponce Grijuela¹ y Yamilé Baró Robaina¹

¹ Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (Inisav). Calle 110 no. 514 e/ 5ta B y 5ta F, Playa, La Habana, Cuba

² Dirección de Ciencia y Técnica de la Universidad de La Habana. Calle M 255 e/ 19 y 21, Plaza de la Revolución, La Habana, Cuba

^a Actualmente: Tecnologías Naturales Internacionales (TNI), Celaya, México

* aponce@inisav.cu

RESUMEN

VersaKlin® es un producto comercial basado en la tecnología de Microorganismos Eficientes™ que pudiera considerarse su uso como agente de control biológico de determinadas plagas agrícolas. El nemátodo *Meloidogyne incognita* constituye una plaga de gran importancia económica en organopónicos y casas de cultivos en Cuba, por lo que VersaKlin® pudiera ser una alternativa más para el biocontrol de este fitoparásito. Los objetivos de este trabajo fueron determinar la actividad antagonista *in vitro* sobre *M. incognita* y detectar convencionalmente las enzimas amilasa, lipasa, gelatinasa, quitinasa y caseinasa. Se probaron distintas concentraciones del producto sobre masas de huevos del fitonemátodo para evaluar la inhibición de la eclosión a las 24, 48, 72 y 120 h de exposición, su efecto sobre la movilidad de los juveniles del segundo estadio (J_2) emergidos y la irreversibilidad; además, se utilizaron cinco medios de cultivo para la determinación enzimática cualitativa en el producto puro y filtrado. Las concentraciones evaluadas (puro, 1:10 y 1:20) lograron la reducción de la eclosión de los huevos, desde las 24 h, con valores superiores al 70 % y con una afectación del 50 % en la movilidad de los J_2 , ambos efectos con carácter irreversible. También se detectó la presencia de enzimas quitinasas y caseinasas en el filtrado del producto, resultados que demuestran las potencialidades para el control de nemátodos y su uso para estudios bajo condiciones controladas.

Palabras claves: Microorganismos Eficientes™, nemátodos, biocontrol, enzimas hidrolíticas.

ABSTRACT

VersaKlin® is a commercial product based on Efficient Microorganisms™ technology that could be considered its use as a biological control agent for certain agricultural pests. The nematode *Meloidogyne incognita* constitutes a pest of great economic importance in organic farms and greenhouses in Cuba, reason why VersaKlin® could be another alternative for the biocontrol of this phytoparasite. The objectives of this work were to determinate the antagonistic activity on *M. incognita* under *in vitro* conditions and to conventionally detect the enzymes amylase, lipase, gelatinase, chitinase and caseinase. Different concentrations of the product were tested on egg masses of the phytonematode the inhibition of hatching at 24, 48, 72 and 120 h of exposure, its effect on the mobility of the juveniles of the second stage (J_2) emerged and the irreversibility; in addition, five culture media were used for qualitative enzymatic determination in the pure and filtered product. The concentrations evaluated (pure, 1:10 and 1:20) achieved the reduction of the hatching of the eggs, from 24 h, with values greater than 70 % and with a 50 % affectation in the mobility of the J_2 , both effects, irreversibly. The presence of chitinase and caseinase enzymes was also detected in the filtrate of the product, results that demonstrate the potential for nematode control and its use for studies under controlled conditions.

Key words: Efficient Microorganisms™, nematodes, biocontrol, hydrolytic enzymes.

INTRODUCCIÓN

Las especies de nemátodos formadores de agallas de las raíces, del género *Meloidogyne* Goeldi se consideran entre las más importantes a nivel mundial (Agrios, 2005), dado su amplio rango de hospedantes (Moens *et al.*, 2009; Tovar, 2014; Ibrahim y Handoo, 2016),

difícil control (Isidro, 2011) y las pérdidas millonarias que causan en los cultivos (Moens *et al.*, 2009; Herrera *et al.*, 2011; Abd- Elgawad, 2014). Particularmente *M. incognita* (Kofoid & White) Chitwood tiene una distribución cosmopolita (CABI/EPPO, 2002) y ata-

ca una gran variedad de cultivos en Cuba (Gómez *et al.*, 2009; Fuentes *et al.*, 2011; Rodríguez *et al.*, 2011; Rivas y Gandarilla, 2012; Almarales *et al.*, 2014).

Para su control se utilizaron los nematicidas químicos durante muchos años, pero los problemas de contaminación ambiental, daños a la salud de los trabajadores, aparición de microorganismos degradadores de las sustancias activas principales y la pérdida de la biodiversidad de las poblaciones antagonistas naturales del suelo han cambiado esta tendencia (Pakeerathan *et al.*, 2009; Cuadra *et al.*, 2013).

Actualmente se aboga por el uso de alternativas efectivas y amigables con el ambiente (Nyczepir y Thomas, 2009; Kariuki *et al.*, 2014). Entre ellas se encuentran la utilización de productos botánicos (Seo *et al.*, 2014; Elohe *et al.*, 2019) y biológicos (Abd-Elgawad y Askary, 2018). Los agentes de control biológico más exitosos pertenecen a hongos y bacterias que actúan como parásitos o por efecto de metabolitos (León *et al.*, 2006; Sorribas y Ornat, 2011; Bhattacharjee y Dey, 2014; Pinzón Espinoza *et al.*, 2015). En Cuba se producen y utilizan en la actualidad bionematicidas a base de bacterias y hongos, como el HeberNem® y el KlamiC®, respectivamente, así como formulaciones artesanales de *Trichoderma* contra estos nemátodos (Fuentes *et al.*, 2011; Fernández *et al.*, 2015; Rodríguez *et al.*, 2015).

Una nueva alternativa biológica se abre paso en la agricultura, la utilización de Microorganismos Eficientes o EM (Effective Microorganisms, siglas en inglés), que consiste en un cultivo mixto de microorganismos (principalmente bacterias fotosintéticas, levaduras, bacterias ácido-lácticas y actinomicetos), de ocurrencia natural, que coexisten en un cultivo líquido. Cuando entran en contacto con materia orgánica secretan una variedad de sustancias bioactivas, fundamentalmente antioxidantes, aminoácidos, vitaminas, enzimas y ácidos orgánicos que mediante el proceso de competencia exclusiva favorecen el crecimiento de los microorganismos nativos, el ecosistema microbiano tiende a equilibrarse, disminuye el porcentaje de patógenos e incluso pueden promover el crecimiento de las plantas (Higa, 1995; Díaz y Montero, 2006; Bueno y Lesmes, 2007; EEAITAJ, 2013). Se conoce además que tienen otros múltiples beneficios como probióticos y antioxidantes, aceleradores de la descomposición de residuos sólidos, eliminación de malos olores y en materiales de la construcción (Flores *et al.*, 2012; EEAITAJ, 2013; Martirena *et al.*, 2014; Romero y Vargas, 2017).

El Instituto Finlay de Cuba dispone de un bioproducto comercial a partir de esta tecnología denominado VersaKlin®, dirigido originalmente a la eliminación de malos olores, así como la desinfección e higiene de superficies. Se ha informado por Alvarado-Capó *et al.* (2015) que este producto redujo la incidencia e intensidad del tizón temprano causado por *Alternaria solani* Sorauer en campos de papa para semilla en Cuba.

Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados, es de interés científico y agrícola evaluar las potencialidades de VersaKlin® como agente de control biológico de otras plagas agrícolas, y se propuso determinar su actividad antagónica sobre el nemátodo *M. incognita* y detectar la presencia de las enzimas hidrolíticas en medios de cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción del producto

VersaKlin® (Instituto Finlay) es un bioproducto comercial que se obtiene por una doble fermentación microbiana a partir de microorganismos nativos y subproductos de las industrias láctea y azucarera (Oliva *et al.*, 2014). Su composición cuantitativa consta de:

- Ácido láctico 30-90 mg/mL
- Ácido acético 10-30 mg/mL
- Bacterias aerobias 10^6 - 10^7 UFC/mL
- Hongos y levaduras 10^6 - 10^8 UFC/mL
- Azúcares reductores 1-2 g/L

Se comercializa como un líquido de color marrón amarillento y olor avinado dulce, cuyo valor de pH oscila entre 3,5-3,8. El producto evaluado cumplía con los estándares de calidad establecidos.

Evaluación de la actividad antagónica in vitro

Se utilizaron masas de huevos de la especie *M. incognita* (Kofoid & White) Chitwood procedentes de raíces agalladas del cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*, L.), identificada mediante criterios morfológicos según Jepson (1987). Las masas de huevos se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio 1,5 % durante 20 s y luego se lavaron tres veces con agua destilada estéril por un minuto.

Como recipientes de evaluación se emplearon vidrios reloj de 60 mm de diámetro, esterilizados previamente, donde se ubicaron las soluciones de los tratamientos y de inmediato se depositaron las masas de huevos desinfectadas. Cada tratamiento estuvo formado por

cuatro vidrios reloj (repeticiones) que se ubicaron en placas Petri de 120 mm esterilizadas, donde se mantuvo la humedad ambiental con algodones humedecidos.

Fueron evaluados tres tratamientos de VersaKlin®: el producto comercial puro, la dilución 1:10 (tomando como base las recomendaciones del fabricante, diluir 100 mL en 1 L de agua) y la dilución 1:20 (solución de 50 mL producto puro/L agua), y un testigo negativo de agua destilada estéril.

Las observaciones se realizaron a las 24, 48, 72 y 120 h, y en cada período de evaluación se contaron los juveniles del segundo estadio (J_2) emergidos y se registró la presencia o no de movilidad mediante observación al microscopio estereoscopio (250 X). Se determinó el Porcentaje de Reducción de la Eclosión respecto al testigo para cada uno de los tratamientos, según la siguiente ecuación (Márquez y Fernández, 2006):

$$\frac{(t - le) \times 100}{t}$$

donde:

t: Valor medio de larvas eclosionadas en el testigo

le: Larvas eclosionadas en los tratamientos

Al final de la evaluación, las masas de huevos donde no se había registrado eclosión y los juveniles que no tenían movimiento se trasladaron igualmente hacia vidrios reloj con agua destilada en cámara húmeda durante 24 h para observar si el efecto se mantenía (irreversibilidad).

Los datos se procesaron por un análisis de varianza simple y comparación de medias (Scott & Knott, $p \leq 0,05$) mediante el paquete estadístico InfoStat versión 2012.

Detección de la actividad enzimática

La presencia de enzimas hidrolíticas se detectó según el procedimiento descrito por Harrigan y McCance (1968), que consiste en utilizar medios de cultivo suplementados con diferentes sustratos como fuentes de carbono: agar almidón (amilasa), medio con Tween 80 al 1 % (lipasa), agar gelatina de Frazier modificado (gelatinasa), agar leche descremada al 10 % (caseinasa), y medio con quitina coloidal (quitinasa). Se evaluaron tres tratamientos de VersaKlin®: el producto comercial puro, el filtrado a través de membrana de nitrocelulosa con diámetro de poro de 0,2 µm y la dilución 1:10 del filtrado (solución de 100 mL filtrado/L agua).

Se emplearon placas de 75 mm con 10 mL de cada medio de cultivo, donde se evaluaron los tratamientos por triplicado. El resultado se basó en la formación de halos de hidrólisis o de opacidad causados por la presencia de las enzimas.

Para las evaluaciones del producto puro se tomó una asada del mismo y se realizó una línea horizontal en las placas, luego se incubaron a 28 °C por 48 h. En el caso de los filtrados, a las placas se les realizaron dos ponchetes de 9 mm de diámetro y se les adicionaron 50 µL de solución, se preincubaron 30 min a 4 °C y luego se incubaron a 28 °C por 48 h.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de la actividad antagonica in vitro

En la *Tabla 1* se pueden observar los resultados del cálculo del porcentaje de reducción de la eclosión de los tratamientos respecto al testigo. Todos los tratamientos evaluados del producto VersaKlin® afectaron la eclosión de los huevos de *M. incognita* desde las 24 h.

En el tratamiento con el producto puro no hubo eclosión hasta las 120 h, donde se observaron algunos juveniles; no obstante, el porcentaje de eclosión fue superior al 90 %, similar a la ocurrida en la dilución 1:10 y con diferencia significativa con 1:20.

Tabla 1. Porcentaje de reducción de la eclosión de huevos de *M. incognita por efecto de diferentes concentraciones de VersaKlin® en cuatro tiempos de exposición**

Percentage of hatching reduction of eggs of *M. incognita** by the effect of diferents concentrations of VersaKlin® at four exposure times

Tratamiento	Tiempo de exposición (h)			
	24	48	72	120
Producto puro	100,00a	100,00a	100,00a	92,44a
Diluido 1:10	100,00a	98,50a	97,74a	92,31a
Diluido 1:20	100,00a	96,62a	96,39a	73,42 b
Testigo	-	-	-	-
CV (%)	9,80	15,20	12,90	13,80
ES	7,9	9,2	9,8	10,1

* Porcentaje de reducción de la eclosión en los tratamientos respecto al testigo

Percentage of hatching reduction in treatments compared to the control.

Medias con letras comunes, en una misma columna, no difieren estadísticamente (Scott & Knott $p \leq 0,05$)

Means with common letters, in the same column, do not differ statistically (Scott & Knott $p \leq 0,05$).

Las diluciones evaluadas se comportaron similar en todos los tiempos de exposición, excepto en 1:20, que mostró una apreciable disminución a las 120 h con valor del 73,42 %.

Relacionado con la movilidad de los juveniles emergidos en los tratamientos se pudo observar como en el producto puro donde solo hubo emergencia a las 120 h, los juveniles estaban inmóviles y con la presencia de

vacuolizaciones internas; igualmente en las diluciones estudiadas los escasos juveniles emergidos se presentaron con características similares, a excepción de la dilución de 1:20, donde hubo mayor emergencia, y de los juveniles presentes el 50 % presentaron movilidad. En el testigo de comparación utilizado los juveniles emergidos mantuvieron su movilidad e integridad interna durante todo el tiempo (Tabla 2).

Tabla 2. Características de los juveniles emergidos en los tratamientos
Characteristics of the emerged juveniles in the treatments

Tratamiento	Tiempo de exposición (h)			
	24	48	72	120
Producto puro	No J ₂	No J ₂	No J ₂	J ₂ inmóviles
Diluido 1:10	No J ₂	J ₂ inmóviles	J ₂ inmóviles	J ₂ inmóviles
Diluido 1:20	No J ₂	J ₂ inmóviles	J ₂ inmóviles	50 % J ₂ inmóviles
Testigo	J ₂ móviles	J ₂ móviles	J ₂ móviles	J ₂ móviles

Respecto a la consideración de si los efectos inhibitorios presentados eran reversibles o no, se pudo determinar que tanto las masas de huevos que no mostraron eclosión, como en los juveniles inmóviles, cuando se depositaron en agua destilada estéril mantuvieron esas características.

Aunque no existen muchas referencias sobre los efectos de los EM sobre los nemátodos formadores de agallas, Isidro (2011) destacó efectos beneficiosos contra estos mediante la utilización en el tomate de una mezcla de varios microorganismos, incluyendo levaduras y actinomicetos de conjunto con los hongos *Paecilomyces lilacinus* y *Trichoderma*.

En otros ensayos realizados igualmente *in vitro* por Hernández-Ochandía *et al.* (2015), donde se utilizaron filtrados de tres cepas de *Trichoderma asperellum*, obtuvieron que incluso la dilución de 1:50 ocasionó porcentajes de mortalidad en los juveniles de *M. incognita* por encima del 70 %, distinguiéndose la cepa Ta. 90 con el 90 % de mortalidad a las 24 h. Así mismo informaron que los juveniles muertos por la acción de los filtrados presentaron deformaciones y rupturas en su cutícula, así como vacuolas y desorganización en el contenido interno, lo que podría relacionarse con las enzimas líticas extracelulares producidas (Martínez *et al.*,1998).

Igualmente, Quesada-Mola *et al.* (2019), al evaluar *in vitro* la acción biológica de nuevos aislados de *Tri-*

choderma spp. sobre *M. incognita*, describieron una reducción de la eclosión de huevos entre el 80-98 % con acción antagonista irreversible, comportamiento similar a los obtenidos en nuestros resultados. Además, detectaron actividad de enzimas quitinasas en todos los aislados ensayados.

El VersaKlin® contiene además ácido láctico y ácido acético (Oliva *et al.*, 2014) que podrían contribuir a su efecto nematocida. Sin embargo, se requieren otros estudios para dilucidar los mecanismos de acción de este bioproducto sobre *M. incognita*.

Los resultados obtenidos son promisorios, ya que el logro de reducciones en la eclosión y la inmovilidad de los juveniles emergidos, así como la irreversibilidad de los efectos, sugiere la posibilidad de poder contar con una nueva alternativa de control de estos nemátodos, lo que debe ser objeto de investigaciones futuras.

Detección de la actividad enzimática

Con la utilización de medios sólidos suplementados se logró realizar la detección cualitativa de enzimas hidrolíticas relacionadas con la actividad biológica en los tratamientos analizados. La presencia de amilasa, lipasa y gelatinasa no fue detectada durante los ensayos realizados (Tabla 3), pues no se observó halo de hidrólisis en ninguno de los tratamientos.

Tabla 3. Detección de enzimas hidrolíticas en VersaKlin® sobre medios sólidos por presencia de halo de hidrólisis
Detection of hydrolytic enzymes in VersaKlin® on solid media by the presence of hydrolysis halo

Tratamiento	Amilasa	Lipasa	Gelatinasa	Quitinasa	Caseinasa
Producto puro	–	–	–	–	–
Filtrado	–	–	–	+	+
F Diluido 1/10	–	–	–	–	–

Ausencia (–) y presencia (+) de halo de hidrólisis en el medio de cultivo.

Absence (–) and presence (+) of hydrolysis halo in the culture médium.

Por otra parte, se observó, solamente en el filtrado, la presencia de un halo claro alrededor de los ponchetes en el medio de cultivo con quitina coloidal y con leche descremada, lo que evidencia la capacidad de producción de enzimas quitinasas y caseinasas por los microorganismos que componen el VersaKlin® (Fig. 1 A y B). Los ensayos para la detección de caseinasa y quitinasa dieron resultados

similares al observarse la ausencia de estas enzimas, tanto en el producto puro como en el filtrado diluido 1:10. Estos resultados pudieran deberse a la ausencia, en el producto comercial final, de microorganismos presentes en el inóculo inicial de la fermentación productores de estos metabolitos, en concentraciones bajas incapaces de detectarse en la dilución 1:10 por esta metodología.

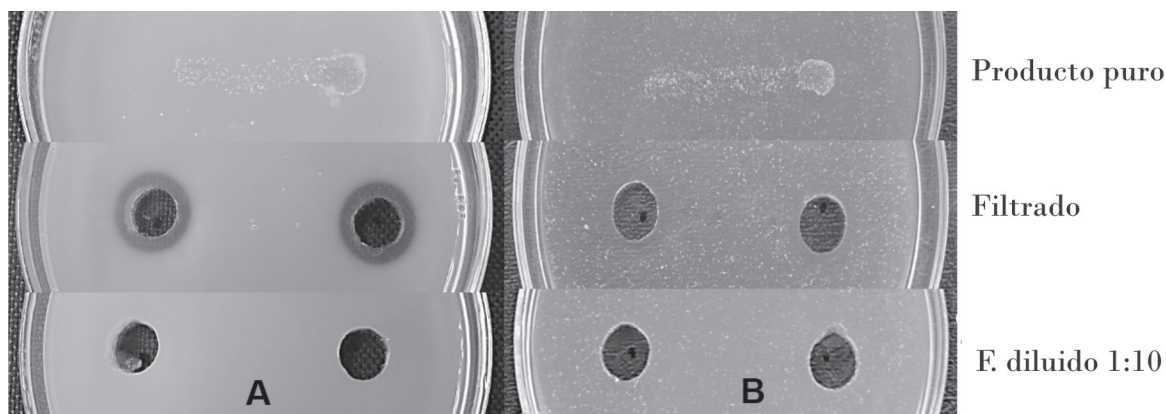


Figura 1. Detección de las enzimas hidrolíticas en los tratamientos evaluados. A: Medio suplementado con leche descremada (caseinasa). B: Medio suplementado con quitina coloidal (quitinasa).

Detection of hydrolytic enzymes in the treatments evaluated. A: Medium supplemented with skim milk (caseinase). B: Medium supplemented with colloidal chitin (chitinase)

Con relación al efecto sobre nemátodos de la excreción extracelular de quitinasas y proteasas, como las caseinasas, se notificó que estas se encuentran presentes en los microorganismos nematófagos y antagonistas para atacar estos invertebrados (Morton *et al.*, 2004), debilitando la envoltura de los huevos (compuestos del 70 % de quitina) y dañando la cutícula de las larvas (Mena *et al.*, 2003; Mokbel *et al.*, 2009). La cutícula de los nemátodos está constituida de material proteico con una capa de lipoproteínas, y la principal estructura de la envoltura o cubierta de los huevos posee tres capas, una externa de vitelina, una media de quitina y otra interna de lípidos (Bird, 1971). Es por ello que las proteasas y quitinasas son las enzimas que juegan un papel más importante para el biocontrol (González *et al.*, 2012).

En el producto VersaKlin® se detectó la presencia de quitinasas y caseinasas, las cuales deben ser las principales responsables de la inhibición de la eclosión de los huevos y de la afectación en la movilidad de los juveniles de *M. incognita* observada en el experimento anterior. Son abundantes los estudios *in vitro* que demuestran que la producción de enzimas como quitinasas y proteasas por especies del género *Trichoderma* determinan la inviabilidad del huevo y la reducción de la penetración de nemátodos (Sahebani *et al.*, 2008; Szabó *et al.*, 2013; Hernández-Ochandía *et al.*, 2015). De la misma manera, se evidenció que la excreción de proteasas y quitinasas al medio de cultivo por *Tsukamurella paurometabola*, ingrediente activo del producto HeberNem®, era la causa de

la actividad nematicida de esta bacteria mediante daños en los huevos y larvas de *M. incognita* (Mena *et al.*, 2003).

El bioproducto, obtenido en el Instituto Finlay a escala industrial mediante una tecnología similar a los EM (Oliva *et al.*, 2014), se presenta como una alternativa viable para su uso como agente de control biológico de plagas agrícolas. En Uruguay, gracias a la aplicación de la tecnología EM, más del 80 % de los productores hortícolas de Bella Unión han reducido más del 60 % el uso de agrotóxicos en los invernáculos y cultivos de campo, y en agricultura extensiva se reduce en un 30 % el uso de herbicidas a base de glifosato (EEAITAJ, 2013). Estos resultados son alentadores y están en correspondencia con los informados por Alvarado-Capó *et al.* (2016) y Díaz (2016) para el bioproducto VersaKlin®.

Con el uso de VersaKlin® en el cultivo de la papa en Cuba, Alvarado-Capó *et al.* (2016) obtuvieron una reducción de la incidencia en un 30 % del tizón temprano en la producción de semilla, con una efectividad técnica que alcanzó hasta el 60 % de la obtenida con productos químicos. De igual manera, Díaz (2016) comprobó en ensayos *in vitro* que el filtrado del bioproducto VersaKlin® inhibió el crecimiento de patógenos fúngicos del cultivo de la papa, con un 100 % de inhibición a las 72 h de incubación. En este caso se empleó el filtrado de cultivo libre de células microbianas; por tanto, el efecto antifúngico estuvo mediado por los metabolitos excretados al medio de cultivo y no por la presencia de otros microorganismos. Atendiendo a estos resultados, ambos autores recomendaron que podría formar parte de estrategias de manejo de enfermedades en la papa.

Los resultados antes expuestos validan los obtenidos en esta investigación, donde igualmente se demuestra la actividad biológica de VersaKlin® frente a una plaga de importancia agrícola, *M. incognita*, lo que ofrece la posibilidad de contar con otra alternativa de biocontrol compatible con el Manejo Integrado de Plagas para este fitopatógeno.

CONCLUSIONES

- El producto VersaKlin® bajo condiciones *in vitro* mostró efectos inhibitorios de la eclosión de huevos de *M. incognita* y afectaciones de los juveniles emergidos, y en ambos casos fueron procesos irreversibles. Es recomendable la continuación de estos estudios bajo condiciones controladas.

- El producto VersaKlin® resultó positivo a la producción de quitinasa y caseinasa, enzimas importantes en la actividad nematicida. Se debe evaluar la producción de otras enzimas como celulasas y glucanasas.
- Se demuestra que el producto comercial VersaKlin® pudiera ser empleado en un manejo fitosanitario como agente biocontrolador del fitonemátodo agallador sobre bases agroecológicas.

REFERENCIAS

- Abd-Elgawad M.M.M. 2014. Plant-parasitic nematode threats to global food security. *Journal of Nematology* 46(2):130.
- Abd-Elgawad M.M.M. y Askary T.H. 2018. Fungal and bacterial nematicides in integrated nematode management strategies. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 28:74.
- Agrios G.N. 2005. Enfermedades de plantas causadas por nematodos. En: Plant Pathology, 5ª Ed., Amsterdam, Países Bajos: Elsevier Academic Press.
- Almarales M., Martín C.V. y Leresma R. 2014. Prospección de nematodos en las zonas agrícolas de la provincia de Cienfuegos. *Revista Agroecosistemas* 2(2): 337- 348.
- Alvarado-Capó Y., de Fera M., Veitia N., Acosta-Suárez M., Díaz A., Freire-Seijo M., Reyes F., Medina R., Oropesa K., Fontes L., Ramírez W. y Martín G. 2015. Efecto del bioproducto VersaKlin® sobre el Tizón temprano en la producción de semilla de papa cv. 'Romano'. *Biotecnología Vegetal* 15(4):233-242.
- Bhattacharjee R. y Dey U. 2014. An overview of fungal and bacterial biopesticides to control plant pathogens-diseases. *African Journal of Microbiology Research* 8: 1749-1762.
- Bird A. 1971. The structure of nematodes. New York, EUA: Academic Press. pp. 318.
- Bueno C. y Lesmes N. 2007. Utilización de Microorganismos Eficientes en levante de novillas brahmán bajo pastoreo semi- intensivo suplementado en la región de Palmira, Valle del Cauca. Universidad de la Salle, Bogotá. Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar por el título como Zootecnista.
- CABI/EPPO. 2002. *Meloidogyne incognita*. Distribution Maps of Plant Diseases. No. 854. 1ª Ed. Wallingford, Reino Unido: CAB International. Disponible en: <https://www.cabi.org/isc/abstract/20066500854>. Consultado en Octubre de 2019.
- Cuadra R., Zayas M.A., Meléndez O., Ramos N., Alvarez S. y Liñeiro L.D. 2013. Medidas agrotécnicas para el control de *Meloidogyne incognita* en cultivo protegido del pepino. *Fitosanidad* 17(3):161-5.
- Díaz A. 2016. Manejo de enfermedades fúngicas en la producción de semilla de papa cv. 'Romano' con bioproductos. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Villa Clara, Cuba. Tesis para optar por el grado académico de Máster en Agricultura Sostenible.
- Díaz O. y Montero D. 2006. Determinación de la acción de E.M. (Microorganismos Eficientes) bajo condiciones de invernadero, sobre la actividad de intercambio catiónico, en la recuperación de un suelo de Mondoñedo. Universidad de La Salle, Bogotá, D.C. Trabajo de investigación para optar al título de Ingeniero Ambiental y Sanitario.
- EEAITAJ. 2013. Microorganismos Eficaces (EM). Estación Experimental Agropecuaria para la Instalación de Tecnologías Apropriadas de Japón. Soriano, Uruguay, http://www.emuruguay.org/PDF/Microorganismos_Eficaces_EM_Presentacion_breve.pdf, Consultado en Abril de 2019.

- Eloh K., Kpegba K., Sasanelli N., Koumaglo H.K y Caboni P. 2019. Nematicidal activity of some essential plant oils from tropical West Africa. *International Journal of Pest Management* DOI:10.1080/09670874.2019.1576950
- Fernández E., Casanueva K., Gandarilla H., Márquez M.E., Despaigne F., Almandoz J. y García M. 2015. Nematodos asociados a las hortalizas bajo cultivo protegido en tres localidades de Cuba. Estudios de caso. *NEMATROPICA* 45(2):32.
- Flores Y., López F. y Villanueva J. 2013. Efecto de los Microorganismos Eficaces (EM) y *Trichoderma* sp. sobre la incidencia de *Fusarium* y *Sclerotium rolfsii* en una siembra experimental de pimentón. *Agro-Illania* 10:38-43.
- Fuentes P., Ferrer E. y Cristo M. 2011. Evaluación de nematocidas biológicos en el control del nematodo agallero (*Meloidogyne incognita* Chitwood) en el cultivo protegido del Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Revista Infocencia* 15(2).
- Gómez L., Rodríguez M.G., Enrique R., Miranda I. y González E. 2009. Factores limitantes de los rendimientos y calidad de las cosechas en la producción protegida de hortalizas en Cuba. *Rev. Protección Veg.* 24(2):117-122.
- González I., Infante D., Martínez B., Arias Y., González N., Miranda I. y Peteira B. 2012. Inducción de quitinasas y glucanasas en cepas de *Trichoderma* spp. promisorias como agentes para el control biológico. *Biología Aplicada* 29:7-11.
- Harrigan W.F. y McCance M. 1968. Técnicas de microbiología aplicada. En: Métodos de laboratorio en Microbiología. León, España: Editorial Academia.
- Hernández-Ochandía D., Rodríguez M. G., Peteira B., Miranda I.; Arias Y. y Martínez B. 2015. Efecto de cepas de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt y Nirenberg sobre el desarrollo del tomate y *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood. *Rev. Protección Veg.* 30(2):139-147.
- Herrera P.E., Cristóbal A.J., Tun J.M., Góngora J.A., Lomas B.T. 2011. Nematofauna nociva (*Meloidogyne* spp.) en cultivos hortícolas tropicales: Distribución y perspectivas de manejo en Yucatán. En: Recursos genéticos microbianos en la zona Golfo-Sureste de México, editado por Rojas, R.H., y A.M. Gamboa. SUBNARGEN. México: Morevalladolid S de R. L. de C. V.
- Higa T. 1995. Effective Microorganisms: concept and recent advances in technology. Memorias de la 4ta Conferencia Internacional de Kyusei Nature Farming, 19-21 Junio 1995. París, Francia. Editado por J. F. Parr y S. B. Hornick. EUA. pp. 247-248.
- Isidro P. 2011. Manejo integrado de *Meloidogyne* en tomate. *Serie Técnica* N° 39. Centro Regional Corrientes, Argentina, EEA INTA Bella Vista.
- Ibrahim I.K.A. y Handoo Z.A. 2016. Occurrence of phytoparasitic nematodes on some crop plants in northern Egypt. *Pakistan Journal of Nematology* 34(2): 163-169.
- Jepson S.B. 1987. Identification of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). Wallingford, Reino Unido: CAB International.
- Kariuki G.M., Muriuki L., Thuo A.K., Kibunja J.W. 2014. Safe and effective nematode and other pests management strategies to strengthen the tomato value chain in coastal Kenya. *Journal of nematology* 46(2):185-186.
- Leon, M., Samaniego L.M., Rodríguez R.C. y Liriano R. 2006. Utilización de *Bacillus thuringiensis* para el control de *Meloidogyne incognita*. *Centro Agrícola* 33(4):17-22.
- Márquez M.E. y Fernández E. 2006. Selección de cepas de *Bacillus thuringiensis* con efecto nematocida. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología 78: 63- 69.
- Martínez B., González R. y Balance C. 1998. Antagonismo de aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre algunos patógenos de caña de azúcar. *Fitopatología*. 33(4):207-211.
- Martirena F., Rodríguez-Rodríguez Y., Callico A., Gonzalez R., Diaz Y., Bracho G., Alujas A., Guerra de Leon J.O. y Alvarado-Capó Y. 2014. Microorganism-based bioplasticizer for cementitious materials. *Construction and Building Materials* 60:91-97.
- Mena J., Pimentel E., Veloz L., Hernández A., León L. y Ramírez Y. 2003. Aislamiento y determinación de cepas bacterianas con actividad nematocida. Mecanismo de acción de *T. paurometabola* C-924 sobre nematodos. *Biotechnol Apl.* 20(4):248-52.
- Moens M., Perry R.N. y Starr J.L. 2009. *Meloidogyne* Species - a diverse group of novel and important Plant Parasites. En: Root-knot Nematodes, editado por R. N. Perry, M. Moens y J. L. Starr. Wallingford, Reino Unido: CAB International.
- Mokbel A.A., Obad I.M. e Ibrahim I.K. 2009. The role of antagonistic metabolites in controlling root-knot nematode, *Meloidogyne arenaria* on tomato. *Alexandria Journal of Agricultural Research* 54 (1):199- 205.
- Morton C.O., Hirsch P.R. y Kerry B. 2004. Infection of plant-parasitic nematodes by nematophagous fungi - a review of application of molecular biology to understand infection processes and to improve biological control. *Nematology* 6:161-170.
- Nyczerip A.P. y Thomas S.H. 2009. Current and Future Management Strategies in Intensive Crop Production Systems. En: Root-knot Nematodes, editado por R. N. Perry, M. Moens y J. L. Starr. Wallingford, Reino Unido: CAB International.
- Oliva R., Fariñas M., Núñez D., García G., Perez Q., Naranjo M., Callico A., Bracho G. y Campa C. 2014. Estudio toxicológico de irritabilidad dérmica y oftalmológica de Microorganismos Eficientes (VersaKlin®). *RETEL* 43:1-14.
- Pakeerathan K., Mikunthan G., Tharshani N. 2009. Effect of different animal manures on *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) on tomato. *World Journal and Agric. Sci.* (5):432-435.
- Pinzón Espinoza L.F., Candelero de la Cruz J., Tun Suárez J.M., Reyes Oregel V. y Alejo C.J. 2015. Control de *Meloidogyne incognita* en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) con la aplicación de *Trichoderma harzianum*. *Fitosanidad* 19(1): 5-11.
- Quesada-Mola Y., Fernández-Gonzálves E., Casanueva-Medina K., Ponce-Grijuela E. y Márquez-Gutiérrez M.E. 2019. Actividad biológica de nuevas cepas cubanas de *Trichoderma* spp. efectivas en el control de *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood. *Revista Cubana de Ciencias Biológicas* 7(1):1-9.
- Rivas O. y Gandarilla H. 2012. Fitonematode species associated to acerola (*Malpighia puniceifolia* L.) in Cuban province of Granma. (Fitonematodos asociados a cereza (*Malpighia puniceifolia* L.) en la provincia de Granma, Cuba.) *Fitosanidad* 16(3):175-177.
- Rodríguez M.G., Hernández D., Enrique R., Gómez L., Díaz-Viruliche L. y Peteira B. 2011. Sintomatología y especies de *Meloidogyne* asociadas a vid (*Vitis vinifera* L. cv. Aramond) en Guira de Melena, Artemisa. (Resultados preliminares). *Rev. Protección Veg.* 26(2):111-117.
- Rodríguez M.G., Gómez L., Fernández E. y Anzardo J.C. 2015. Manejo de *Meloidogyne* spp. en la producción protegida de hortalizas en condiciones tropicales: Caso de estudio Cuba. *NEMATROPICA* 45(2):38.
- Romero T. y Vargas D. 2017. Uso de microorganismos eficientes para tratar aguas contaminadas. *Ingeniería hidráulica y ambiental XXXVIII*(3):88-100.
- Sahebani N. y Hadavi N. 2008. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Soil Biology & Biochemistry* 40(2):2016-2020.
- Seo S-M., Kim J., Koh S-H., Ahn Y-J., Park I-K. 2014. Nematicidal activity of natural ester compounds and their analogues against pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *J Agric Food Chem.* 62(37): 9103-9108.
- Sorribas F.J. y Ornat C. 2011. Estrategias de control integrado de nematodos fitoparásitos. En: Enfermedades causadas por nematodos

fitoparásitos en España, editado por M.V. Phytoma-España S.L.: Editoras Científicas.

during *in vitro* nematodes egg-parasitism. *Biological Control* 67: 337-343.

Szabó M., Urbán P., Virányi F., Kredics L. y Fekete C. 2013. Comparative gene expression profiles of *Trichoderma harzianum* proteases

Tovar S.A. 2014. Géneros y especies de importancia en la agricultura en México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 4:34-35.



LEER

INFORMACIÓN DEL MINISTERIO DE EDUCACIÓN SUPERIOR

Revistas científicas autorizadas para las publicaciones de los doctorantes

Estas revistas se relacionan en varios grupos, donde están las extranjeras y las cubanas, especificándose que solamente serán aceptadas las publicaciones de los grupos 1 y 2.

En el grupo 1 están las revistas de mayor impacto internacional.

En este grupo se encuentra de Cuba, la revista cubana de Ciencias Agrícolas del Instituto de Ciencia Animal (ICA).

En el grupo 2 de Cuba están:

1. Fitosanidad del Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV)
2. Protección Vegetal del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA)
3. Cultivos Tropicales del Instituto Nacional de Ciencia Agrícola (INCA)

El resto de las revistas cubanas están en otros grupos.

Esto constituye un incentivo más para mantener la frecuencia y calidad de Fitosanidad, y una buena oportunidad para aprovechar por nuestros investigadores, así como los de otras instituciones nacionales o extranjeras que deseen publicar en ella.