

Establecimiento *in vitro* del hongo nematófago *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* en diferentes suelos
***In vitro* establishment of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* in different soils**

**Wilson Geobel Ceiro-Catasú¹ , Maité Hidalgo-Viltres¹ , Leopoldo Hidalgo-Díaz² ,
Jersys Arévalo-Ortega² , Milagro García-Bernal^{3,4}  y José Manuel Mazón-Suástegui^{3‡} **

¹ Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Granma. Carretera Bayamo-Manzanillo km 17½. 85100 Bayamo, Granma, Cuba.

² Dirección de Sanidad Vegetal, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Apartado 10. 32700 San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

³ Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. Av. Instituto Politécnico Nacional no. 195, Colonia Playa Palo de Santa Rita Sur. 23096 La Paz, Baja California Sur, México.

[‡]Autor para correspondencia (jmazon04@cibnor.mx)

⁴ Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central de Las Villas (CBQ-UCLV). Carretera a Camajuani km 5½. 54830 Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

RESUMEN

Las condiciones edáficas presentes en los agroecosistemas pueden influir en el establecimiento y la efectividad de un agente de control microbiano para nematodos. Por esta razón, se propuso como objetivo de la presente investigación, evaluar el establecimiento *in vitro* de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* en suelos agrícolas cubanos de tipo Ferralítico, Fluvisol y Pardo. Para ello, tres tipos de suelos se analizaron mediante la técnica suelo membrana, evaluándose en cada uno de ellos las poblaciones microbianas nativas, el crecimiento micelial y el crecimiento relativo del hongo nematófago de interés. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado y el procesamiento estadístico de los datos se realizó mediante un ANOVA factorial y regresión lineal. Los resultados demostraron que, *P. chlamydosporia* var. *catenulata* creció y produjo clamidosporas en todas las condiciones edáficas evaluadas, no obstante, el mayor crecimiento se registró en los suelos Fluvisol y Ferralítico comparado con el Pardo. Lo cual sugirió, que las mayores poblaciones microbianas nativas y el pH ácido presente en el suelo Pardo, pudieron afectar el crecimiento de este hongo. Los resultados confirman que la especie fúngica nematófaga *P. chlamydosporia* var. *catenulata* posee capacidad de adaptación, persistencia y multiplicación

en diferentes suelos y se sugiere su utilización en los suelos Fluvisol, Ferralítico y Pardo, siempre que no presenten un pH ácido ≤ 4.17 .

Palabras clave: control biológico de nematodos, manejo de *Meloidogyne*, técnica suelo membrana.

SUMMARY

The edaphic conditions present in agroecosystems can influence the establishment and effectiveness of a microbial control agent for nematodes. For this reason, the objective of the present investigation was proposed to evaluate the *in vitro* establishment of *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* in Cuban agricultural soils of the Ferralitic, Fluvisol and Brown type. For this, three types of soils were analyzed using the soil membrane technique, evaluating in each one of them the native microbial populations, the mycelial growth and the relative growth of the nematophagous fungus of interest. A completely randomized design was used and the statistical processing of the data obtained was performed using a factorial ANOVA and linear regression. The results showed that *P. chlamydosporia* var. *catenulata* grew and produced chlamydo spores in all the edaphic conditions evaluated, however, the greatest growth was registered in Fluvisol and Ferralitic

Cita recomendada:

Ceiro-Catasú, W. G., Hidalgo-Viltres, M., Hidalgo-Díaz, L., Arévalo-Ortega, J., García-Bernal, M. y Mazón-Suástegui, J. M. (2021). Establecimiento *in vitro* del hongo nematófago *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* en diferentes suelos. *Terra Latinoamericana* 39: 1-7. e792. <https://doi.org/10.28940/terra.v39i0.792>

Recibido: 12 de mayo de 2020. Aceptado: 07 de septiembre de 2020.
Artículo. Volumen 39, enero de 2021.

soils compared to Pardo. This suggested that the higher native microbial populations and the acid pH present in the Brown soil, could affect the growth of this fungus. The results obtained confirm that the nematophagous fungal species *P. chlamydosporia* var. *catenulata* has adaptability, persistence and multiplication capacity in different soils and its use is suggested in Fluvisol, Ferralitic and Brown soils, provided they do not present an acid pH ≤ 4.17 .

Index words: *biological control of nematodes, Meloidogyne management, soil membrane technique.*

INTRODUCCIÓN

Las interacciones biológicas y los sinergismos entre los componentes de la biodiversidad, son principios ecológicos básicos que pueden manejarse para posibilitar y potenciar el desarrollo de procesos y servicios claves en el agroecosistema (Álvarez *et al.*, 2014; Sarandón y Flores, 2014; Rosset y Torres, 2016), enfocados al control biológico de organismos plaga. Al respecto, el hongo parásito facultativo de huevos de nematodos *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* posee una fase de vida saprofítica, durante la cual sobrevive a partir de los nutrientes existentes en la materia orgánica del suelo o sustrato, mientras que, durante su fase parasítica depende de su hospedante común, que generalmente son nematodos fitoparásitos (Kerry y Hirsch, 2011).

P. chlamydosporia var. *catenulata* posee la capacidad de adaptarse a diferentes condiciones edáficas y se supone que la actividad microbiana nativa del suelo influye sobre su crecimiento y desarrollo (Monfort *et al.*, 2006). Por otra parte, se considera que las características químicas presentes en los suelos y sustratos, a pesar de que han sido poco estudiadas, pueden influir en la adaptación ecológica del hongo (Kerry y Hirsch, 2011).

Por otro lado, la capacidad de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* para colonizar los suelos, los sustratos y la rizosfera vegetal, así como su actividad parasítica, es esencial en la selección de aislamientos para el manejo de nematodos fitoparásitos (Viggiano *et al.*, 2014; Bontempo *et al.*, 2014; Ceiro e Hidalgo, 2017). Se sabe que esa especie fúngica produce clamidosporas, las cuales se consideran estructuras de resistencia frente a condiciones ecológicas adversas en su medio natural, por ello, constituyen la principal fuente de inóculo de

los productos basados en esa especie fúngica (Ceiro *et al.*, 2014).

Actualmente, la selección de cepas fúngicas efectivas para la obtención de productos biológicos seguros para el manejo de nematodos formadores de agallas y otras dianas, en cultivos de importancia económica, es un gran desafío para la ciencia contemporánea (Ravensberg, 2011). Por esa razón, en Cuba se obtuvo un bioproducto robusto, consistente y seguro denominado KlamiC® a partir de la cepa IMI SD 187 de *P. chlamydosporia* var. *catenulata*, el cual se usa en el manejo efectivo de *Meloidogyne* spp., en cultivos hortícolas (Montes de Oca *et al.*, 2009).

No obstante, en los suelos Ferralíticos, Fluvisoles y Pardos dedicados en Cuba a Sistemas de Producción Protegidos de Hortalizas (SPPH), se registran afectaciones por poblaciones nativas de *Meloidogyne* y se desconoce si este hongo nematófago logra establecerse en dichos suelos. Por ello, se propuso como objetivo de la presente investigación, evaluar el establecimiento *in vitro* de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* en suelos Ferralítico, Fluvisol y Pardo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para evaluar el establecimiento del hongo en los suelos se utilizó la técnica suelo membrana según Grose *et al.* (1984) y Monfort *et al.* (2006) que permite evaluar la receptividad de suelos al hongo nematófago *P. chlamydosporia*. Se utilizaron tres tipos de suelo recomendados para el establecimiento de SPPH en Cuba (Casanova, 2007) (Cuadro 1).

Cada suelo se tamizó a un tamaño de partícula de un milímetro y se tomaron porciones para esterilizarlas durante 45 min en autoclave, permaneciendo el resto en su forma natural. Se adicionaron 20 g de cada suelo (esterilizado y sin esterilizar) en placas Petri y luego se añadió cuidadosamente agua destilada estéril hasta lograr humedecimiento total. Seguidamente se colocó una membrana de acetato de celulosa (tamaño de poro 0.2 μ) y sobre la misma se ubicó un disco de 5 mm de la cepa IMI SD 187 de *P. chlamydosporia* var. *catenulata*, procedente de la periferia de una colonia joven desarrollada en medio agar-papa-dextrosa (APD, BioCen).

Por último, las placas se sellaron con *parafilm* y se incubaron durante 21 días a 25 °C en la oscuridad. Transcurrido ese tiempo las membranas se retiraron, se enjuagaron con agua destilada estéril para eliminar

Cuadro 1. Principales características de los suelos analizados.
Table 1. Main characteristics of the soils analyzed.

Suelos	Procedencia	Ca	Mg	P	N	MO	pH	CE
		- - - cmol kg ⁻¹ - - -	- - -	mg kg ⁻¹	- - - - - % - - - - -			dS m ⁻¹
Ferralítico [†] (Ferralsol)	Habana	37.0	27.5	910.0	3.53	6.10	8.20	0.63
Fluvisol [†] (Fluvisol)	Granma	23.8	15.3	671.6	2.16	3.79	7.73	0.85
Pardo [†] (Cambisol)	Granma	15.0	37.5	319.0	7.20	4.59	4.17	0.89

([†]) Clasificación Genética de los Suelos de Cuba. () World Reference Base.

([†]) Genetic Classification of the Soils of Cuba. () World Reference Base.

restos de suelo, se trasladaron a placas Petri y finalmente se tiñeron con *cotton blue* durante 12 h a temperatura ambiente.

Evaluaciones

Microorganismos Nativos Totales de cada Suelo

Conteo de hongos totales (UFC g⁻¹): un gramo de suelo se diluyó en nueve mL de agar-agua (AA) {0.5 g de agar bacteriológico (BioCen) por litro de H₂O destilada}, seguidamente se realizaron diluciones seriadas hasta 10⁻³, y de esta última se añadieron 0.2 mL sobre dos placas con agar maltosa sabouraud (BioCen) y fueron incubadas en oscuridad a 25 °C durante 72 h y pasado ese tiempo se cuantificaron las unidades formadoras de colonias.

Conteo de bacterias totales (UFC g⁻¹): un gramo de suelo se diluyó en nueve mL de AA; seguidamente se realizaron diluciones seriadas hasta 10⁻⁴, y de esta última se añadieron 0.2 mL sobre dos placas con agar-triptona-soya (BioCen). Enseguida, las placas se incubaron en oscuridad a 25 °C durante 24 h y al cabo de ese tiempo se cuantificaron las unidades formadoras de colonias.

El crecimiento micelial de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* sobre la membrana se determinó con una regla graduada. A partir de estos resultados se determinó el crecimiento relativo mediante la Ecuación 1:

$$CR = CNE/CE \text{ (Grünwald et al., 1997),}$$

donde:

CR = crecimiento relativo;

CNE = crecimiento en suelo no estéril

CE = crecimiento en suelo estéril.

Presencia de clamidosporas: las membranas fueron observadas en un microscopio óptico Zeiss-Axiolab® a 200 aumentos para confirmar la presencia de esporas.

Diseño Experimental

Se conformaron seis tratamientos, mediante la combinación de los tipos de suelo y niveles de esterilización, bajo un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial (factor I: suelos; factor II: niveles de esterilización) y seis réplicas por cada tratamiento.

Análisis Estadístico

Los datos obtenidos del análisis de poblaciones microbianas (bacterias y hongos) y el crecimiento micelial del hongo nematófago, se analizaron mediante ANOVA factorial y la prueba de comparación múltiple de medias de Duncan ($P \leq 0.05$). El crecimiento relativo del hongo nematófago se procesó mediante ANOVA unifactorial y la prueba de Duncan ($P \leq 0.05$). Se aplicó un análisis de regresión lineal para determinar la relación existente entre las poblaciones nativas de microorganismos presentes en los suelos, sobre el crecimiento de *P. chlamydosporia* var. *catenulata*. El procesamiento estadístico se realizó con el paquete estadístico InfoStat v. 8 (Di Rienzo, 2008).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se encontraron diferencias significativas entre los agrupamientos de suelos en las variables poblaciones fúngicas, bacterianas y en el crecimiento micelial de *P. chlamydosporia* var. *catenulata*. En el suelo Pardo se registraron las mayores poblaciones nativas de bacterias (7.3×10^6 UFC) y hongos (1.2×10^5 UFC), respectivamente, seguido del Ferralítico (5.0×10^6 ; 0.5×10^5 UFC) y por último el Fluvisol (4.8×10^6 ; 0.3×10^5 UFC). Por otra parte, el crecimiento micelial de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* en suelo estéril y sin esterilizar reveló los mayores valores en los suelos Fluvisol (23.67; 60.00 mm) y Ferralítico (22.67; 60.00 mm) en comparación con el Pardo (11.00; 49.00 mm) (Cuadro 2). El hongo nematófago produjo clamidosporas en todas las condiciones edáficas evaluadas (Figura 1).

Las mayores poblaciones microbianas nativas registradas en el suelo Pardo, coincidieron con el menor desarrollo del hongo nematófago. Esto puede ser atribuible a una mayor competencia e interacciones entre los microorganismos de ese suelo con *P. chlamydosporia* var. *catenulata*. No obstante, en el suelo Pardo, una vez suprimida la actividad microbiana se constató menor desarrollo del hongo nematófago, lo cual sugiere que además de la actividad biótica, existen otras propiedades del suelo, que incidieron en el crecimiento de *P. chlamydosporia* var. *catenulata*.

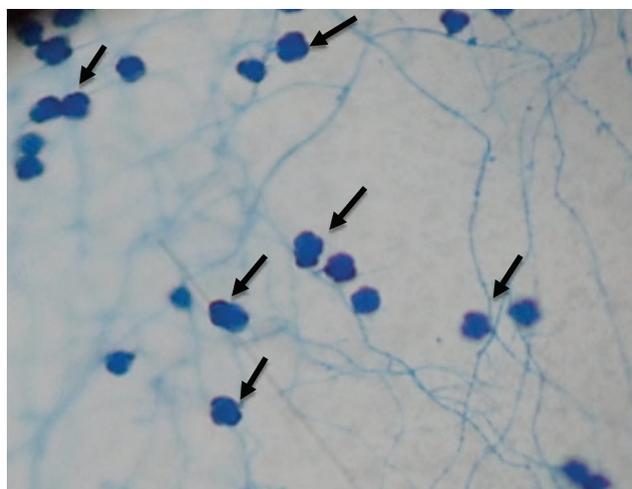


Figura 1. Presencia de clamidosporas de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* sobre las membranas en el suelo Pardo.

Figure 1. Presence of chlamydospores of *P. chlamydosporia* var. *catenulata* on the membranes in the Pardo soil.

Probablemente, el pH ácido (4.7) del suelo Pardo influyó en el menor crecimiento de la especie fúngica. En ese sentido, Gao *et al.* (2009) informaron que en medio de cultivo ajustado a un pH ácido (4.0), el crecimiento micelial de la cepa HSY-12-14 de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* se redujo un 39%. Sin embargo, en otro estudio Hasanzadeh *et al.* (2012), sustentaron que este mismo hongo produce la mayor cantidad de micelio *in vitro* en un rango de pH entre 5-7.

Cuadro 2. Poblaciones microbianas nativas, crecimiento micelial y presencia de clamidosporas de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* en tres tipos de suelos.

Table 2. Native microbial populations, mycelial growth and presence of chlamydospores of *P. chlamydosporia* var. *catenulata* in three types of soils.

Suelos	Estéril	Conteo bacterias		Conteo hongos		DC (mm)±DE	C
		UFC	†UFC±DE	UFC	†UFC±DE		
Fluvisol	No	4.8×10^6	6.68 ± 0.10 b	0.3×10^5	4.57 ± 0.11 c	23.67 ± 1.21 c	Si
Ferralítico	No	5.0×10^6	6.70 ± 0.05 b	0.5×10^5	4.72 ± 0.12 b	22.67 ± 1.37 c	Si
Pardo	No	7.3×10^6	6.85 ± 0.09 a	1.2×10^5	5.08 ± 0.03 a	11.00 ± 1.26 d	Si
Fluvisol	Si	-	-	-	-	60.00 ± 0.00 a	Si
Ferralítico	Si	-	-	-	-	60.00 ± 0.00 a	Si
Pardo	Si	-	-	-	-	49.00 ± 2.37 b	Si

† Transformación $\text{LOG}_{10}x+1$. DC = diámetro de la colonia; DE = desviación estándar; C = presencia de clamidosporas. Letras distintas en las columnas evidencian diferencias significativas ($P \leq 0.05$), según la prueba de Duncan.

† $\text{LOG}_{10}x+1$ transformation. DC = colony diameter; DE = standard deviation; C = presence of chlamydospores. Different letters in the columns show significant differences ($P \leq 0.05$), according to Duncan's test.

Los resultados obtenidos sugieren que, para garantizar una mayor población del hongo y efectividad sobre su diana, deben tomarse medidas de manejo en el agroecosistema, como la corrección de la acidez del suelo, previo a la utilización de la cepa IMI SD 187 de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* para el manejo de nematodos fitoparásitos. La presencia de clamidosporas constatada en los suelos evaluados pone de manifiesto que el hongo se multiplica bajo las condiciones edáficas evaluadas y produce estructuras de resistencia. Esto ratifica a las clamidosporas como la principal fuente de inóculo de esta especie fúngica (Ceiro *et al.*, 2014; Escudero *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2017).

De acuerdo con los resultados de la prueba de Duncan, el crecimiento relativo de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* reveló diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre los agrupamientos de suelos. La especie fúngica alcanzó el mayor crecimiento en los suelos Fluvisol (0.39) y Ferralítico (0.37) en comparación con el Pardo (0.25). El resultado pone de manifiesto que los suelos Fluvisol y Ferralítico objeto de estudio, fueron más receptivos al establecimiento de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* que el Pardo (Figura 2).

Por otra parte, la relación obtenida entre las poblaciones de microorganismos nativos de los suelos evaluados, respecto al crecimiento del hongo nematófago, reveló que al aumentar las poblaciones microbianas decreció el desarrollo de *P. chlamydosporia*

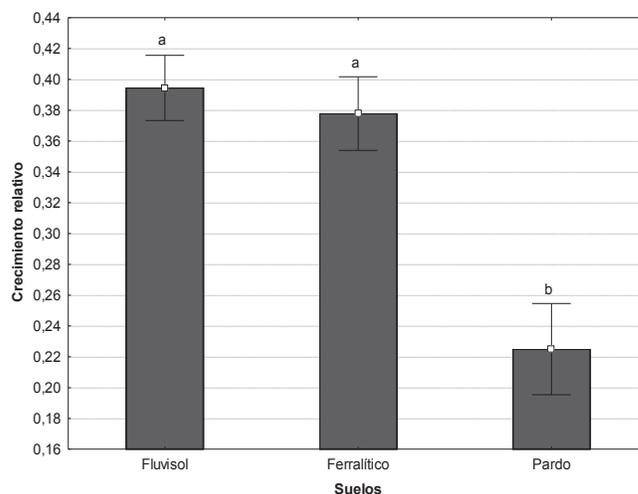


Figura 2. Crecimiento relativo alcanzado por *P. chlamydosporia* var. *catenulata* en cada tipo de suelo. Letras distintas sobre las barras evidencian diferencias significativas ($P \leq 0.05$), según la prueba de Duncan. Las líneas sobre las barras indican el error estándar.

Figure 2. Relative growth achieved by *P. chlamydosporia* var. *catenulata* in each type of soil. Different letters on the bars show significant differences ($P \leq 0.05$), according to Duncan's test. The lines above the bars indicate the standard error.

var. *catenulata*. Los mayores valores de pendiente y coeficiente de determinación fueron determinados mayormente por efecto de las especies fúngicas (-14.26 y 0.86) en comparación con las especies bacterianas (-2.11 y 0.37) (Figura 3 A, B).

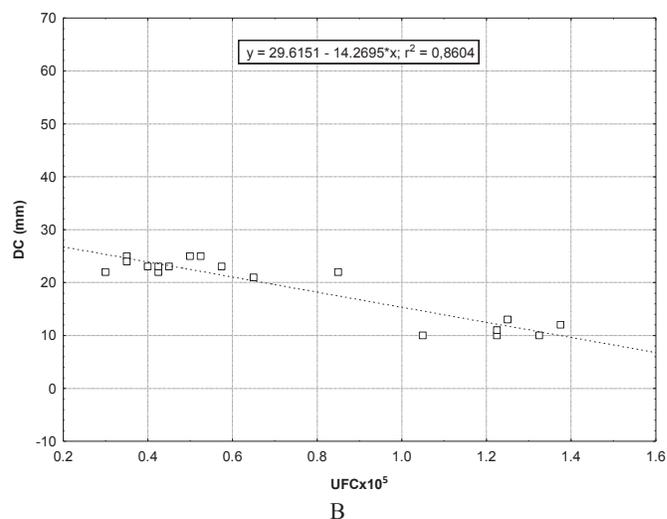
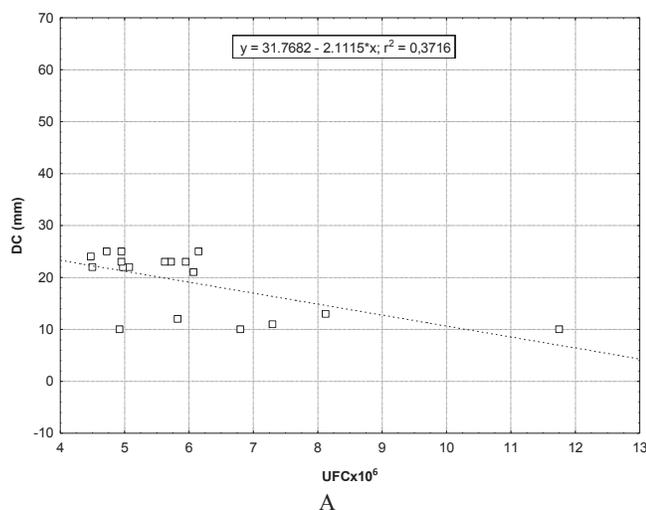


Figura 3. Relación entre las poblaciones bacterianas totales (A) y fúngicas totales (B) sobre el crecimiento micelial de *P. chlamydosporia* var. *catenulata*. DC = diámetro de la colonia; UFC = unidades formadoras de colonias.

Figure 3. Relationship between total bacterial (A) and total fungal (B) populations on mycelial growth of *P. chlamydosporia* var. *catenulata*. DC = colony diameter; CFU = colony-forming units.

Este resultado confirma que las poblaciones fúngicas incidieron más que las bacterianas en la reducción del crecimiento de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* bajo las condiciones experimentales evaluadas. Esto puede ser consecuencia de que existe una estrecha relación filogenética entre los hongos del suelo y *P. chlamydosporia* var. *catenulata*, los cuales comparten características comunes de hábitat, formas de alimentación y hospedantes (Stirling, 2011). Nuestros resultados se relacionan con las suposiciones sustentadas por Monfort *et al.* (2006), en el sentido de que el éxito del establecimiento de *P. chlamydosporia* en los suelos, dependió aparentemente de las poblaciones microbianas nativas.

Las evidencias encontradas en el presente estudio demuestran la persistencia y multiplicación de la cepa IMI SD 187 de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* en diferentes condiciones edáficas. Igualmente, señalan la importancia de realizar estudios previos de establecimiento de este hongo al suelo, para minimizar riesgos edáficos que pudieran afectar la actividad biológica del mismo frente a su diana común (*Meloidogyne* spp.). Finalmente, la persistencia de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* bajo las condiciones edáficas analizadas, tiene una estrecha relación con la activa actividad saprófita de este hongo en suelos y sustratos (Manzanilla *et al.*, 2013).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos señalan que dos elementos esenciales, uno biótico relativo a la actividad microbiana de los suelos y el otro abiótico, referido al pH de estos, pueden influir significativamente en el establecimiento del hongo nematófago y sugieren que el uso de la cepa IMI SD 187 de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* para el manejo biológico de *Meloidogyne* spp., en suelos Fluvisol, Ferralítico y Pardo, es eficiente siempre que no presenten un pH ácido.

DECLARACIÓN DE ÉTICA

No aplicable.

CONSENTIMIENTO PARA PUBLICACIÓN

No aplicable.

DISPONIBILIDAD DE DATOS

Los conjuntos de datos utilizados o analizados durante el estudio actual están disponibles del autor correspondiente, a solicitud razonable.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no tienen intereses en competencia.

FONDOS

El estudio fue co-financiado por la Universidad de Granma y la Dirección de Sanidad Vegetal del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (Cuba), y por el Fondo Sectorial de Investigación para la Educación (México), proyecto Proinnova CONACYT/PEASA 241777, bajo la responsabilidad de JMMS.

CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

Conceptualización: W.G.C.C., M.H.V., L.H.D., J.A.O. y J.M.M.S. Metodología: W.G.C.C., M.H.V., L.H.D., J.A.O. y M.G.B. Software: W.G.C.C., M.H.V., L.H.D. y J.A.O. Validación: W.G.C.C., M.H.V., L.H.D. y J.A.O. Análisis formal: W.G.C.C., M.H.V., L.H.D., J.A.O. y M.G.B. Investigación: W.G.C.C., M.H.V., L.H.D. y J.A.O. Recursos: W.G.C.C. y J.M.M.S. Curación de datos: W.G.C.C., M.H.V., L.H.D. y J.A.O. Escritura, preparación del borrador original: W.G.C.C. Escritura, revisión y edición: W.G.C.C., M.G.B. y J.M.M.S. Visualización: W.G.C.C., M.H.V., L.H.D., J.A.O. y M.G.B. Supervisión: W.G.C.C., M.G.B. y J.M.M.S. Administración del proyecto: W.G.C.C. y J.M.M.S. Adquisición de fondos: W.G.C.C. y J.M.M.S.

LITERATURA CITADA

- Álvarez-Salas, L. M., D. N. Polanco-Echeverry y L. A. Ríos-Osorio. 2014. Reflexiones acerca de los aspectos epistemológicos de la agroecología. Cuad. Desarr. Rural 11: 55-74. doi: <https://doi.org/10.11144/javeriana.CRD11-74.raea>.
- Bontempo, A. F., R. H. Fernandes, J. Lopes, L. G. Freitas, and E. A. Lopes. 2014. *Pochonia chlamydosporia* controls *Meloidogyne incognita* on carrot. Aust. Plant Pathol. 43: 421-424. doi: <https://doi.org/10.1007/s13313-014-0283-x>.
- Casanova, A. S. 2007. Manual para la producción protegida de hortalizas. Instituto de Investigaciones Hortícolas Liliana Dimitrova. La Habana, Cuba. ISBN: 9789597111375.

- Ceiro, W. G. y L. Hidalgo-Díaz. 2017. Interacción entre *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (Kamyschko ex Barron y Onions) Zare y Gams y *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood en tomate en presencia de NaCl. *Rev. Protec. Veg.* 32: 76-81.
- Ceiro, W. G., J. Arévalo, A. L. Puertas y L. Hidalgo-Díaz. 2014. Efecto de concentraciones de NaCl sobre el crecimiento micelial y la esporulación de *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare y Gams en medio PDA y suelo. *Rev. Protec. Veg.* 29: 122-127.
- Di Rienzo, J. A., F. Casanoves, M. G. Balzarini, L. Gonzalez, M. Tablada y C. W. Robledo. 2008. InfoStat, versión 2008, Grupo InfoStat, FCA. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.
- Escudero, N., F. Lopez-Moya, Z. Ghahremani, E. A. Zavala-Gonzalez, A. Alaguero-Cordovilla, C. Ros-Ibañez, A. Lacasa, F. J. Sorribas, and L. V. López-Llorca. 2017. Chitosan increases tomato root colonization by *Pochonia chlamydosporia* and their combination reduces root-knot nematode damage. *Front Plant Sci.* 8: 1415. doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01415>.
- Gao, L., X. Liu, M. Sun, Sh. Li, and J. Wang. 2009. Use of a novel two-stage cultivation method to determine the effects of environmental factors on the growth and sporulation of several biocontrol fungi. *Mycoscience* 50: 317-321. doi: <https://doi.org/10.1007/S10267-009-0483-3>.
- Grose, M. J., C. A. Parker, and K. Sivasithamparam. 1984. Growth of *Gaeumannomyces graminis* var *tritici* in soil: Effects of temperature and water potential. *Soil Biol Biochem.* 16: 211-216. doi: [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(84\)90003-8](https://doi.org/10.1016/0038-0717(84)90003-8).
- Grünwald, N. J., F. Workneh, S. Hu, and A. H. C. van Bruggen. 1997. Comparison of an *in vitro* and a damping-off assay to test soils for suppressiveness to *Pythium aphanidermatum*. *Eur. J. Plant Pathol.* 103: 55-63. doi: <https://doi.org/10.1023/A:1008603006217>.
- Hasanzadeh, M., M. Mohammadifar, N. Sahebany, and H. R. Etebarian. 2012. Effect of cultural condition on biomass production of some Nematophagous fungi as biological control agent. *Egypt. Acad. J. Biol. Sci.* 5: 115-126. doi: <https://doi.org/10.21608/eajbsa.2012.14947>.
- Kerry, B. R. and P. R. Hirsch. 2011. Ecology of *Pochonia chlamydosporia* in the rhizosphere at the population, whole organism and molecular scales. pp. 171-182. *In*: D. K. Spiegel Y. (ed.). *Biological control of plant-parasitic nematodes. Progress in Biological Control*, vol 11. Springer. Dordrecht. doi: https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9648-8_7.
- Manzanilla, R., I. Esteves, M. Finetti, P. Hirsch, E. Ward, J. Devonshire, and L. Hidalgo-Díaz. 2013. *Pochonia chlamydosporia*: Advances and challenges to improve its performance as a biological control agent of sedentary endoparasitic nematodes. *J. Nematol.* 45: 1-7.
- Monfort, E., L. V. Lopez-Llorca, J. Hans-Börje, and J. Salinas. 2006. *In vitro* soil receptivity assays to egg-parasitic nematophagous fungi. *Mycol. Progress* 5: 18-23. doi: <https://doi.org/10.1007/s11557-005-0002-7>.
- Montes de Oca, N., J. Arévalo, A. Nuñez, Y. Riverón, A. Villoch y L. Hidalgo-Díaz. 2009. Klamic: Experiencia técnica-productiva. *Protec. Veg.* 24: 2-4.
- Ravensberg, W. J. 2011. Critical factors in the successful commercialization of microbial pest control products. Chapter 7. pp. 295-355. *In*: W. J. Ravensberg (ed.). *A roadmap to the successful development and commercialization of microbial pest control products for control of arthropods.* Springer Science+Business Media B.V. Netherlands. ISBN: 978-94-007-0436-7.
- Rosset, P. M. y M. E. Martínez-Torres. 2016. Agroecología, territorio, recampesinización y movimientos sociales. *Estudios Sociales. Rev. Alim. Contemp. Desarr. Reg.* 25: 273-299.
- Sarandón, S. J. y C. C. Flores. 2014. *Agroecología: Bases teóricas para el diseño y manejo de agroecosistemas sustentables.* Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). Buenos Aires, Argentina. ISBN 978-950-34-1107-0.
- Silva, S. D., R. M. D. G. Carneiro, M. Faria, D. A. Souza, R. G. Monnerat, and R. B. Lopes. 2017. Evaluation of *Pochonia chlamydosporia* and *Purpureocillium lilacinum* for Suppression of *Meloidogyne enterolobii* on Tomato and Banana. *J. Nematol.* 49: 77-85. doi: <https://doi.org/10.21307/jofnem-2017-047>.
- Stirling, G. R. 2011. Biological control of plant-parasitic nematodes: An ecological perspective, a review of progress and opportunities for further research. Chapter 1. pp 1-38. *In*: K. Davies and Y. Spiegel (eds.). *Biological control of plant-parasitic nematodes building coherence between microbial ecology and molecular mechanisms.* Progress in biological control, vol. 11. Springer Science. Dordrecht, Netherlands. doi: https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9648-8_1.
- Viggiano, J. R., L. G. de Freitas, and E. A. Lopes. 2014. Use of *Pochonia chlamydosporia* to control *Meloidogyne javanica* in cucumber. *Biol. Cont.* 69:72-77. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.11.004>.