

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA

PROGRAMA DE ENSEÑANZA

ÁREA DE POSGRADO

*Pasteuria penetrans*: ADHERENCIA Y PARASITISMO EN  
*Meloidogyne incognita* y *Meloidogyne arabicida*

Tesis sometida a la consideración del Comité Técnico  
Académico del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias  
Agrícolas y Recursos Naturales del Centro Agronómico Tropical  
de Investigación y Enseñanza, para optar al grado de

Magister Scientiae

Por

Tomás Rojas Miranda

CATIE  
Turrialba, Costa Rica

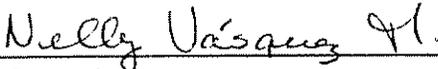
1993

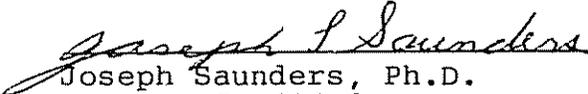
Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma, por la Jefatura del Area de Postgrado en Ciencias Agricolas y Recursos Naturales del CATIE y aprobada por el Comité Asesor del estudiante como requisito parcial para optar al grado de:

**MAGISTER SCIENTIAE**

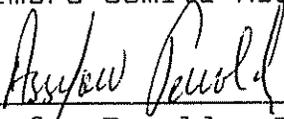
FIRMANTES:

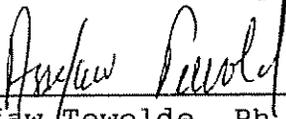
  
\_\_\_\_\_  
Nahum Marbán, Ph.D.  
Profesor-Asesor

  
\_\_\_\_\_  
Nelly Vásquez, MSc.  
Miembro Comité Asesor

  
\_\_\_\_\_  
Joseph Saunders, Ph.D.  
Miembro Comité Asesor

  
\_\_\_\_\_  
Manuel Carballo, MSc.  
Miembro Comité Asesor

  
\_\_\_\_\_  
Assefaw Tewelde, Ph.D.  
Jefe, Area de Postgrado

  
\_\_\_\_\_  
Assefaw Tewelde, Ph.D.  
Director, Programa de Enseñanza

  
\_\_\_\_\_  
Tomás Rojas Miranda  
Candidato

A Dios Todopoderoso por haberme dado la sabiduría e inteligencia para terminar con éxito mis estudios

A mi esposa Lissette Vega y a nuestros hijos Tomás y Carolina por su amor, cariño y comprensión en los momentos difíciles

A mis padres Manuel Rojas y Sidely Miranda por estar siempre en los buenos y malos momentos dándome apoyo

A mis suegros Julio Vega y Mireya Sánchez por su constante apoyo

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Nahum Marbán por los conocimientos impartidos, colaboración y gran apoyo en el transcurso de mi estadía en el CATIE.

A la Biol. Nelly Vásquez, MSc. por su abnegada colaboración y atinados consejos durante la elaboración de la presente investigación.

Al Dr. Joseph Saunders y al Ing. Manuel Carballo, MSc. por la revisión y sugerencias durante la elaboración del presente trabajo.

Al Dr. Víctor Villalobos por el apoyo brindado durante el proceso de ingreso al Programa de Maestría.

Al Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza por la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado en tan importante centro de enseñanza.

Al Ministerio de Agricultura y Ganadería por el tiempo concedido para realizar mis estudios de posgrado.

Al Ing. Adrián Figueroa por su constante apoyo y consejos profesionales.

A mis amigos y colegas José Antonio Aguilar y Galileo Rivas por su amistad, colaboración y apoyo durante los años de estudiantes.

A mis compañeros de trabajo por su amistad y comprensión, en especial al señor Jorge Meckbel C.

Al Gobierno Británico por el otorgamiento de la beca que permitió el financiamiento de mis estudios.

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
RESUMEN	viii
SUMMARY	ix
LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE ANEXOS	xiii
I. INTRODUCCION	1
II. REVISION DE LITERATURA	4
2.1 Aspectos del género <i>Meloidogyne</i>	4
2.2 Importancia económica del género <i>Meloidogyne</i>	6
2.3 Asociación de <i>Meloidogyne</i> con otros organismos del suelo	7
2.4 Control de los nematodos parásitos de plantas	8
2.4.1 Combate químico de fitonematodos	8
2.4.2 Control de nematodos por medio de malezas, coberturas y plantas antagónicas	11
2.4.3 Enemigos naturales de los fitonematodos	13
2.4.3.1 Hongos como enemigos de nematodos fitoparásitos	14
2.4.3.2 Las bacterias como agentes reguladores naturales de poblaciones de nematodos	15
2.4.4 Uso de <i>P. penetrans</i> como agente biocontrolador de nematodos	16
2.4.4.1 Taxonomía de <i>Pasteuria penetrans</i>	16
2.4.4.2 Ciclo de vida de <i>Pasteuria penetrans</i>	17
2.4.4.3 Especificidad de huésped	18

2.4.4.4	Forma de producir <i>P. penetrans</i>	23
III.	MATERIALES Y METODOS	25
3.1	Localización de los experimentos	25
3.2	Adherencia de esporas de <i>P. penetrans</i> en estados juveniles (J2) de <i>M. arabicida</i> y <i>M. incognita</i>	25
3.3	Efecto de <i>P. penetrans</i> en el desarrollo de <i>M. arabicida</i> y <i>M. incognita</i> en raíces de tomate, bajo condiciones de invernadero	26
3.3.1	Plantas de prueba	26
3.3.2	Fuente de inóculo de <i>M. arabicida</i> y <i>M. incognita</i>	27
3.3.3	multiplicación de inóculo de <i>Pasteuria penetrans</i>	27
3.3.4	Nematicida empleado	28
3.3.5	Método de extracción y conteo de nematodos	28
3.3.6	Comprobación de la infección de <i>P. penetrans</i> en <i>M. arabicida</i> y <i>M. incognita</i>	29
3.3.7	Diseño Experimental	29
3.3.8	Tratamientos	30
3.3.9	Variables a medir	30
3.4	Estudios histológicos	31
3.5	Aplicación de diferentes técnicas para la comprobación de adherencia	32
IV.	RESULTADOS Y DISCUSION	34
4.1	Adherencia de <i>P. penetrans</i> a juveniles (J2) de <i>M. arabicida</i> y <i>M. incognita</i> a través del tiempo	34
4.2	Efecto de <i>P. penetrans</i> en el desarrollo de <i>M. arabicida</i> y <i>M. incognita</i> en raíces de tomate bajo condiciones de invernadero	40
4.2.1	Porcentaje de agallamiento	40

4.2.2	Población final en raíces de <i>M. incognita</i> y <i>M. arabicida</i> y su tasa de multiplicación	43
4.2.3	Comprobación de patogenicidad de <i>P. penetrans</i>	46
4.2.4	Población final de nematodos en el suelo	49
4.2.5	Peso fresco y seco de follaje y raíces en las plantas de tomate bajo los distintos tratamientos	52
4.3	Cortes histológicos	54
V.	CONCLUSIONES	58
VI.	RECOMENDACIONES	60
VII.	BIBLIOGRAFIA	61
VIII	ANEXOS	69

ROJAS MIRANDA, T. 1993. *Pasteuria penetrans*: Adherencia y parasitismo en *Meloidogyne incognita* y *Meloidogyne arabicida*. Tesis Mag. Sc. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 74 p.

## RESUMEN

Los nematodos son organismos que causan daños severos a los cultivos. Frecuentemente, éstos son controlados por medio de productos químicos, los cuales pueden contaminar los agroecosistemas sino se emplean adecuadamente. Una alternativa para controlar las poblaciones de fitonematodos a niveles no perjudiciales es por medio de controladores naturales. La bacteria *Pasteuria penetrans* es un parásito obligado de nematodos con gran potencial como nematocida biológico.

El objetivo primordial del trabajo fue evaluar *P. penetrans* como agente controlador de los nematodos agalladores *Meloidogyne incognita* y *Meloidogyne arabicida*. Para ello se realizaron pruebas de adherencia de las esporas de *P. penetrans* a la cutícula de juveniles (J2) de los nematodos en mención. Además, a nivel de invernadero se estudió el efecto de la bacteria en el desarrollo de *M. incognita* y *M. arabicida* en raíces de tomate.

La adherencia de *P. penetrans* fue evidente a las 24 horas con un promedio de ocho esporas por J2 para *M. incognita* y cuatro esporas para *M. arabicida*, con un 95 por ciento de juveniles con esporas adheridas para el primero y un 75 por ciento para el segundo. El nematocida ethoprop 5G redujo en un 80 por ciento el agallamiento provocado por *M. incognita* y en un 83 por ciento en *M. arabicida*. *P. penetrans* redujo en un 44 por ciento el agallamiento causado por *M. incognita* y en un 36 por ciento en *M. arabicida*. La bacteria disminuyó en un 71.2 por ciento la tasa de multiplicación en *M. incognita* y en un 63% en *M. arabicida*. Se observó una mayor patogenicidad para *M. incognita*, con un 45 por ciento y un 30 por ciento para *M. arabicida*.

El efecto de *P. penetrans* a las futuras generaciones de los nematodos fue evidente, ya que se obtuvo un 51 por ciento de *M. incognita* de la población final de suelo con esporas de la bacteria adherida a la cutícula y un 22 por ciento para *M. arabicida*.

Los resultados de adherencia y parasitismo nos hacen suponer que *P. penetrans* es más específico para *M. incognita* que para *M. arabicida* y se concluye que *P. penetrans* puede ser considerado como un nematocida biológico.

ROJAS MIRANDA, T. 1993. *Pasteuria penetrans*: Adherence and parasitism in *Meloidogyne incognita* and *Meloidogyne arabicida*. Tesis Mag. Sc. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 74 p.

#### SUMMARY

Nematodes are organisms which cause severe damages to crops. They are frequently controlled utilizing chemical products, which can contaminate the agroecosystems when use improperly. A viable alternative in order to control plant nematode populations to non harmful levels is through natural controllers. The bacterium *Pasteuria penetrans* is a nematodes obliged parasite with great potential as biologic nematicide.

The main purpose of this research was to evaluate the possibilities of *P. penetrans* as control agent of *Meloidogyne incognita* and *Meloidogyne arabicida* root-knot nematodes. For that reason, adherence tests of *P. penetrans* to juvenine (J2) cuticles of the above mentioned nematodes were conducted. The effect of *P. penetrans* regarding the development of *M. incognita* and *M. arabicida* on tomato roots was also evaluated.

*P. penetrans* adherence was evident after 24 hours of inoculation, showing an average of eight spores per J2 of *M. incognita* and four spores per J2 of *M. arabicida*. There was also 95 percent of spores adhered to juveniles for the first species and 75 percent for the second. The nematicide ethoprop 5G reduced 80 and 83 percent of the galling caused by *M. incognita* and *M. arabicida* respectively. *P. penetrans* reduced 44 percent of the galling originated by *M. incognita* and 36 percent of the same parameter for *M. arabicida*. The bacterium decreased in 71.2 percent *M. incognita's* multiplication rate and in 63 percent *M. arabicida's*. It was observed a higher pathogenicity level (45 percent) for *M. incognita*, than for *M. arabicida* (30 percent).

The effect of *P. penetrans* to future nematode generations was evident since 51 percent of *M. incognita's* and 22 percent of *M. arabicida's* final soil populations had bacterium spores adhered to their cuticles.

The adherence and parasitism results allow to assume that *P. penetrans* is more specific for *M. incognita* than for *M. arabicida* and it is concluded that *P. penetrans* can be considered a biologic nematicide.

## LISTA DE CUADROS

		Página
CUADRO No.		
1.	Porcentaje de agallamiento en plantas de tomate para los diferentes tratamientos provocados por <i>M. arabicida</i> y <i>M. incognita</i>	41
2.	Promedio poblacional de <i>M. incognita</i> y <i>M. arabicida</i> en raíces de tomate y su tasa de multiplicación	45
3.	Número promedio de hembras maduras de <i>M. arabicida</i> y <i>M. incognita</i> parasitadas y sanas con <i>P. penetrans</i>	47
4.	Promedio poblacional de <i>M. arabicida</i> y <i>M. incognita</i> en 300 gr de suelo, número de juveniles (J2) con <i>P. penetrans</i> adheridos y su porcentaje	50
5.	Peso fresco y seco de follaje y raíces en las plantas de tomate, bajo diferentes tratamientos	53

## LISTA DE FIGURAS

Página

FIGURA No.

- |    |   |    |
|----|---|----|
| 1. | <p>Número promedio de esporas de <i>P. penetrans</i> adheridas a la cutícula de J2 de <i>M. arabicida</i> y <i>M. incognita</i> en función del tiempo (h)</p>   | 35 |
| 2. | <p>Porcentaje de J2 de <i>M. arabicida</i> y <i>M. incognita</i> con <i>P. penetrans</i> adherida a su cutícula en función del tiempo (h)</p>   | 36 |
| 3. | <p>Endosporas de <i>P. penetrans</i> atacando la cutícula de J2 en <i>M. incognita</i>. A: fotografía microscopio de luz mostrando esporas de <i>P. penetrans</i> (e: esporas, n: nematodos) (200X), B, C: parte media de J2 con esporas de <i>P. penetrans</i> (e: esporas, n: nematodos) (1300 X y 6000X)</p> | 38 |
| 4. | <p>Endosporas de <i>P. penetrans</i> atacando la cutícula de J2 en <i>M. arabicida</i>. A: porción anterior del J2 mostrando gran número de esporas (e: esporas de <i>P. penetrans</i>, n: nematodo) (3000 X). B, C: esporas adheridas a la región central del nematodo (e: esporas) (7000X)</p>                | 39 |
| 5. | <p>Esporas de <i>P. penetrans</i> liberadas del cuerpo de <i>Meloidogyne</i>. A: esporas de <i>P. penetrans</i> extraídas de <i>M. incognita</i> (e: esporas) (200X). B: esporas de la bacteria obtenidas de <i>M. arabicida</i> (e: esporas, n: nematodo) (200X)</p>   | 48 |

6. Secciones transversales de raíz, donde se observa la hembra de *Meloidogyne*, así como la formación de células gigantes. A: raíz infiltrada en parafina (n:nematodo, c:célula gigante) (40X). B: raíz infiltrada en resina (n:nematodo, cg:célula gigante, cc: células corticales, x:xilema) (20X) 55
7. Esporas de *P. penetrans* teñidas con "acridin orange". A: esporas adheridas a la cutícula de un J2, (e: esporas, n: nematodo)(200X), B: esporas liberadas del cuerpo de un nematodo (e: esporas)(200X) 57

LISTA DE CUADROS EN EL ANEXO

		Página
CUADRO No.		
1	Preparación del Ethoprop a 10 ppm	70
2	Escala para estimar el índice de agallamiento en el sistema radical en plantas de tomate ( <i>Lycopersicon esculentum</i> ) provocado por <i>Meloidogyne</i>	71
3	Procesamiento de muestras para infiltración en parafina (para plos plus)	72
4	Procesamiento de muestras para infiltración en resina	74

## I. INTRODUCCION

En Costa Rica de unos 18 géneros de nematodos fitoparásitos del café, el género *Meloidogyne* sp. es el más importante (Figueroa 1974). Es probable que de la gran diversidad y cantidad de fitonematodos existentes en el suelo, no hayan sido descritas todas sus especies.

Recientemente una población de *Meloidogyne* sp. en el cultivo de café, cerca del pueblo de Juan Vías (Cartago, Costa Rica), correspondió a una nueva especie denominada *Meloidogyne arabicida* (López y Salazar 1989). La interacción de este nematodo junto a otros microorganismos del suelo provoca una corchosis en las raíces (Marban *et. al* 1989).

Las pérdidas ocasionadas por los nematodos parásitos de plantas pueden ser cuantiosas. En Estados Unidos, se gastaron, durante 1976, aproximadamente \$19 millones en químicos para combatir a los fitonematodos en tabaco (Taylor y Sasser 1983) . Las pérdidas ocasionadas por estos organismos a los cultivos pueden alcanzar de un 25 a un 50 por ciento (Taylor y Sasser 1983). En el cultivo de arroz, en Panamá, *Meloidogyne salasi* ocasionó pérdidas de un 15 a un 20 por ciento (Aguilar 1993).

Los fitonematodos han sido combatidos tradicionalmente con sustancias químicas, desde que Carter (1943), descubrió que el dicloropropeno era un nematicida eficiente. Aunque esto estimuló la investigación sobre los nematodos, también provocó un gran aumento en la producción y consumo de plaguicidas, contaminando el ambiente. En California, el uso excesivo de aldicarb produjo una gran contaminación ya que este nematicida puede moverse fácilmente a través del suelo, permaneciendo en aguas subterráneas por varios años (Glynn 1989).

En Costa Rica, más de 600 trabajadores de compañías bananeras se vieron afectados con esterilidad al trabajar en el campo aplicando dibromocloropropeno (DBCP) para el control de los fitonematodos (Ramírez y Ramírez, 1980).

Por los problemas anteriormente citados, el control biológico de nematodos fitoparásitos por medio de enemigos naturales está tomando gran importancia. Entre los enemigos naturales de los fitonematodos se pueden citar: hongos, insectos, ácaros, turbelarias, nematodos, virus, protozoarios y bacterias (Sayre 1971).

Uno de los organismos más promisorios y con gran potencial biocontrolador es la bacteria *Pasteuria penetrans* (Thorne) Sayre y Starr. Este organismo es un parásito obligado de nematodos, en especial del género *Meloidogyne*,

el cual inhibe la producción de masas de huevos y afecta las futuras generaciones (Stirling 1991).

El presente trabajo de investigación se realizó con el propósito de:

- a) Evaluar la bacteria *Pasteuria penetrans* como agente controlador de los nematodos agalladores *Meloidogyne incognita* y *Meloidogyne arabacida*.
- b) Evaluar la capacidad de adherencia de las esporas de *P. penetrans* en juveniles (J2) de *M. arabacida* y *M. incognita*.
- c) Determinar el efecto de *P. penetrans* en la reducción del porcentaje de agallamiento, poblaciones finales y tasa de multiplicación ocasionado por *M. arabacida* y *M. incognita*.
- d) Medir el porcentaje de infección de *P. penetrans* en *M. arabacida* y *M. incognita*.

## II. REVISION DE LITERATURA

### 2.1 Aspectos del género *Meloidogyne*

Los primeros estudios del género *Meloidogyne* fueron realizados por Berkeley (1855), quien los llamó vidrios. El primer nombre científico dado a este nematodo fue *Anguilulla mariconi* Cornu (1879) por los síntomas similares causados por *Anguilulla radicumicola* (Canto 1982).

En Brasil, Jobert (1878) observó en raíces de café numerosas agallas que contenían "quistes" con paredes hialinas, así como huevos y larvas que emergían de ellas, no obstante, él no dio nombre a este nematodo. Goldi (1887) estudió el mismo problema y creó el género *Meloidogyne*, describiendo a *M. exigua*.

El género *Meloidogyne* ha sido objeto de muchas revisiones; Goodey (1932) lo denomina *Heterodera morioni*, porque se asemeja más a *Heterodera* que a *Anguilulla*. La taxonomía del género *Meloidogyne* fue complicada hasta que Chitwood (1949), hizo una revisión del género y concluyó que no pertenecen al género *Heterodera* debido a la existencia de diferencias morfológicas entre ambos géneros. Este autor describió

cuatro especies adicionales *M. hapla*, *M. arenaria*, *M. javanica* y *M. incognita* (Taylor y Sasser 1983).

Paralelamente a los trabajos de Chitwood, se desarrollaron investigaciones con nematocidas, demostrando la importancia económica de éstos organismos. Por tal motivo, el número de nematólogos creció y los trabajos sobre el género *Meloidogyne* también. Para 1976, se habían descrito unas 36 especies de este género, (Taylor y Sasser 1983).

López y Salazar (1989), describieron una especie nueva de *Meloidogyne* en café (*Coffe arabica* L. cv. Caturra) en el distrito de Juan Viñas, Cantón de Jiménez, Provincia de Cartago, Costa Rica, la cual denominaron como *Meloidogyne arabicida*. Los síntomas a nivel de follaje ocasionados por este nematodo consisten en un pobre desarrollo de la planta, clorosis fuerte seguida por una defoliación severa, momificación y caída de frutos y el sistema radical poco desarrollado, con engrosamientos grandes y numerosos, tanto en la raíz principal como en las axilares y secundarias. Estas raíces presentan un resquebrajamiento en la corteza. Al abrir las agallas, es posible observar una gran cantidad de tejido corchoso. La asociación de *M. arabicida* con hongos como *Fusarium oxysporum*, *Cylindrocladium* spp. y *Phialophora* spp. causan la

sintomatología descrita en las raíces de café (Marbán *et al* 1989a).

La especie *Meloidogyne* pertenece al Phylum Nemata, a la clase Secernentea, Orden Tylenchida, Super familia Tylenchoidea, familia Meloidogynidae y género *Meloidogyne*.

## 2.2. Importancia económica del género *Meloidogyne*

En los Estados Unidos campos infestados con nematodos pueden perder en rendimiento hasta un 24.5%, si los mismos no se tratan con nematicidas. En Carolina del Norte, para el año 1976, los cultivadores de tabaco gastaron aproximadamente US\$19 millones en tratamientos químicos y se presume que para los países en vías de desarrollo, las pérdidas atribuidas al género *Meloidodyne* oscilan entre un 25 y un 50% (Taylor y Sasser 1983).

En el cultivo de arroz se ha perdido entre un 30 y un 50% o más de su rendimiento, cuando hay fuertes ataques de nematodos (Gómez *et al.* 1981).

### 2.3 Asociación de *Meloidogyne* con otros organismos del suelo

Uno de los factores de inicio y desarrollo de enfermedades en las plantas es la posible asociación de más de un microorganismo en una planta hospedera. Los nematodos parásitos de plantas, a menudo desempeñan un papel muy importante en las interrelaciones. Actualmente se conocen algunas asociaciones de nematodos con hongos, bacterias y virus ( Jatala 1982, Taylor y Sasser 1983).

La primera interrelación la detectó Atkinson (1892) cuando observó que la marchitez del algodón se incrementaba cuando estaban juntos *Meloidogyne* spp. y *Fusarium*.

Un reconocimiento de nematodos, realizado por Rojas (1989) en el cultivo de pimiento (*Piper nigrum*), mostró que existía gran mortalidad de plantas cuando *M. incognita* y *Fusarium* estaban presentes.

Este mismo autor encontró que existe relación entre la marchitez y muerte del jengibre, cuando el nematodo nodulador de la raíz está asociado con la bacteria *Erwinia* sp.

## 2.4 Control de los nematodos parásitos de plantas

Los nematodos fitoparásitos son combatidos principalmente con métodos químicos; aunque existen otros métodos que pueden tener resultados satisfactorios, como son, prácticas culturales y el control biológico principalmente con hongos y bacterias (Zavaleta 1985, Rodríguez 1991, Taylor y Sasser 1983).

### 2.4.1 Combate químico de fitonematodos

El combate de nematodos fitoparásitos es realizado por diferentes métodos, pero la práctica más empleada es por medio de sustancias químicas llamadas nematicidas, que en muchos casos se convierten en la única herramienta disponible.

El uso de los nematicidas comenzó en 1745 y aumentó hasta ser un negocio rentable. En la actualidad, se considera que los nematicidas comparten aproximadamente del 5 al 7% del mercado mundial de plaguicidas (Marbán 1985). El uso de estos compuestos químicos por lo agricultores se realiza con el fin de disminuir las poblaciones de nematodos y de incrementar el rendimiento y calidad de los cultivos que son afectados.

Algunos nematicidas empleados a través del tiempo han sido retirados del mercado internacional, pero aún así son muy utilizados. (Taylor y Sasser 1983).

Los nematicidas se pueden dividir en dos grupos: el primer grupo son los fumigantes, los cuales son inyectados al suelo directamente y se subdividen en hidrocarburos alifáticos halogenados como el dibromuro de etileno, las mezclas de 1,3 dicloropropeno y el bromuro de metilo. Los liberadores del isotiocianato de metilo, como el Dazomet o Milene (3.5-dimetil-tetrahidro-2H-1.3.5 thiadizina-2-tiona). Estos nematicidas penetran la cutícula del nematodo, actuando en las actividades fisiológicas. Causan inhibición de enzimas y del metabolismo de este organismo provocando su muerte (Marban 1985, Taylor y Sasser 1983).

El segundo grupo son los nematicidas no fumigantes, los cuales fueron desarrollados en la década 1951-1960. En los últimos 25 años, no se han desarrollado nuevos productos (Marban 1985). Entre los productos más usados en la actualidad tenemos: Aldicarb (Temik), Carbofurán (Furadán), Ethoprop (Mocap), Phenamiphos (Nemacur) y Oxamyl (Vydate) (Taylor y Sasser 1983). Este grupo de organofosforados y carbamatos, actúan como

inhibidores de la actividad neuromuscular, reduciendo la capacidad de movimiento, infección, alimentación, reproducción y tasa de desarrollo (Bunt 1975). Sin embargo, estudios realizados por Marban y Viglierchio (1980), con concentraciones muy bajas de estos compuestos, confirman que los mismos afectan las actividades sensoriales y de comportamiento del nematodo. Además inhibe la eclosión, emergencia, defecación, osmo regulación, etc. sin causar la muerte del nematodo directamente, ya que los nematodos no dependen del movimiento para realizar el intercambio gaseoso y pueden soportar largos períodos de hambruna. Es por esto que se les ha denominado a estos productos como "nemastáticos".

Estudios realizados durante dos años consecutivos con carbofurán 5G en el cultivo de café (Figueroa 1978), mostraron una disminución de los nematodos y un aumento en el rendimiento con respecto al testigo.

Trabajos realizados con diferentes nematicidas en Panamá (1989), para el combate del nematodo dorado *Globodera rostachiensis*, el cual es un limitante importante para la producción de papa, se encontró que el Furadán 10G (25 kg/ha) fue el que produjo mayor rendimiento (16.53 ton/ha), comparado con los

otros nematocidas probados (Miral 10G, Vydate L) y la combinación de Furadán 10G 18.75 kg/ha + Vydate L 217/ha).

#### 2.4.2 Control de nematodos por medio de malezas, coberturas y plantas antagónicas

Existen plantas que son productoras de sustancias tóxicas, inhibidoras de crecimiento y que pueden actuar como barreras físicas. Christie (1986) manifestó que las malezas y coberturas vegetales pueden reducir las poblaciones de fitonematodos ya que incrementa la biota del suelo y por consiguiente los enemigos naturales de los fitonematodos.

Helenita y Lehman (1978) identificaron 18 especies diferentes de las familias Compositae, Amaranthaceae, Rubiaceae, Cruciferae, Gramineae, Malvaceae, Solanaceae y Cucurbitaceae, como hospederos alternos que les permitió conocer qué cultivo podría sembrarse y qué tipo de manejo podría dársele a las malezas. Rojas (1990a), encontró que las poblaciones de *Pratylenchus* sp., en maíz, aumentaron cuando el suelo estaba sin malezas y éstas poblaciones disminuyeron cuando el cultivo permanecía con cierta cantidad de las mismas.

Los trabajos realizados con coberturas vegetales para el combate de los fitonematodos han dado resultados promisorios. Domínguez *et al* (1990) estudiaron el efecto de coberturas como *Arachis pintoii*, *Pueraria phaseoloides*, *Centrosema pubescens*, *Desmodium ovaliflorum*, *Centrosema acutifolium* sobre el nematodo nodulador de la raíz *Meloidogyne arabicida* y encontraron que ninguna de las especies es hospedadora del nematodo.

Mc. Sorley y Dickson (1989) estudiaron, durante dos años, el comportamiento de las poblaciones de nematodos fitoparásitos, utilizando para su control coberturas vegetales como centeno (*Secale cerealea*) y vicia (*Vicia villosa*), encontrando que las poblaciones de *Belanolaimus longicandatus*, *Criconemella sphaerocephala*, *Meloidogyne incongnita* y *Pratylenchus brachyurus* no aumentaron cuando se establecieron tales coberturas. Por otro lado, Vilardi y Gonzaga (1980), encontraron que la mucuna (*Stizolobium aterrím*) afectó directamente el número de larvas de *Meloidogyne incongnita* que alcanzaron las raíces.

Según Marbán *et al* (1989b), algunas leguminosas producen exudados radiculares como lectina (Con A) que pueden perturbar el mecanismo químico-sensorial del nematodo.

Existe cierta cantidad de plantas antagónicas a los nematodos parásitos de plantas. Una de ellas es *Tagetes* spp. Belcher y Mussey (1977) demostraron que la reducción de la población de *Meloidogyne* puede ser de un 97% utilizando dicha planta.

La población de *Pratylenchus* sp. en el suelo, comparado con los tratamientos testigo, disminuyó sustancialmente cuando en éste se plantó *Tagetes* sp. En el testigo (plantas susceptibles a *Pratylenchus* sp.) las poblaciones aumentaron tanto en el suelo como en la raíz (Rojas 1990b).

#### 2.4.3 Enemigos naturales de los fitonematodos

El control biológico es una opción que se debe considerar para el manejo de fitonematodos ya que en la naturaleza existen una serie de organismos como hongos, bacterias, turbelarias, insectos, ácaros y virus que afectan a los nematodos de plantas (Sayre 1971). El enfoque general en el área de control

biológico de nematodos ha sido la búsqueda de estos agentes antagónicos.

#### 2.4.3.1 Hongos como enemigos de nematodos fitoparásitos

Sayre (1971) y Webster (1972) se refieren a dos tipos de hongos que matan nematodos: los atrapadores y los parásitos endozóicos. Los atrapadores capturan los nematodos por medio de redes adhesivas, nudos adhesivos o adherentes, por ramas laterales cortas de sus hifas y por anillos, que son hifas que se contraen para atrapar nematodos. Estos hongos producen aparentemente una toxina que mata el nematodo y luego lo invade.

Los hongos endozóicos tienen esporas que se adhieren a la cutícula y germinan, formando tubos que penetran al cuerpo por las aberturas naturales del nematodo (boca, ano, poro excretor, vulva).

Se han detectado más de 150 especies de hongos que pueden atacar a los nematodos, entre los que se encuentran *Stylopage* spp, el cual efectúa la captura por medio de hifas adhesivas individuales; *Arthrobotrys* spp. y *Nematoctenus* spp. los cuales poseen una especie de nódulos que se adhieren a la

cutícula del nematodo. En el caso de *Dactylaria* spp. éste forma anillos constringentes con los cuales captura los nematodos (Goes y Rooy 1988).

Entre los géneros de hongos endoparásitos de fitonematodos se pueden citar: *Catenaria* spp., *Myczocytiium* spp., *Hoptoglossa* spp., *Meristacrum* spp., *Verticillum* spp., *Cephalosporium* spp. y *Harposporium* spp (Rodríguez 1991).

Existen especies de hongos asociados con los quistes y huevos de nematodos de los géneros *Globodera* spp, *Heterodera* spp y *Meloidogyne* spp; de éstos los más importantes son: *Cylindrocarpon* sp., *Exophilo* sp., *Fusarium* sp, *Gliocladium* sp, *Paecilomyces* sp y *Verticillium* sp (Morgan-Jones y Rodríguez-Kabana 1985).

#### 2.4.3.2 Las bacterias como agentes reguladores naturales de poblaciones de nematodos

A pesar de que las bacterias son un grupo abundante de microorganismos del suelo, se han realizado pocos esfuerzos para estudiar el potencial que éstos representan. Las posibles causas son 1) las bacterias son menos conspicuas que los hongos, 2)

los efectos de los hongos son, en muchos casos, espectaculares y 3) las bacterias son más difíciles de identificar y propagar que los hongos (Zavaleta 1985).

Se han encontrado diversas bacterias asociadas a la cutícula, a la cavidad del cuerpo, al aparato digestivo y a las gónadas de los nematodos (Sayre 1971). El único caso bien documentado de una bacteria parasitando nematodos es *Pasteuria penetrans*, la cual tiene un gran potencial como agente de control biológico (Zavaleta 1985).

#### 2.4.4. Uso de *P. penetrans* como agente biocontrolador de nematodos

##### 2.4.4.1 Taxonomía de *Pasteuria penetrans*

La taxonomía de *P. penetrans* ha sido objeto de continuas confusiones, desde que Thorne (1940) la describió como *Duboscqia penetrans* pensando que era un protozoario. Estudios posteriores, realizados por Mankau (1975), utilizando el microscopio electrónico, revelaron que era un organismo procariótico y lo nombraron como *Bacillus penetrans*. Sin embargo, es hasta hace poco tiempo que Sayre y Starr en 1985, establecieron bases sólidas para la

taxonomía de este grupo de hiperparásitos, colocando a esta bacteria en el género *Pasteuria* y renombrándola como *Pasteuria penetrans* (Stirling 1991).

#### 2.4.4.2 Ciclo de Vida de *Pasteuria penetrans*

El ciclo de vida de *P. penetrans* se desarrolla en sincronía con el nematodo nodulador de la raíz. Este organismo se empieza a asociar con el nematodo cuando sus esporas se adhieren a la cutícula de segundos estadios juveniles (J2) (Stirling 1991).

Con el propósito de que se efectúe una infestación efectiva, deben haber aproximadamente 5 esporas adheridas a la cutícula del nematodo (Stirling 1984). Los nematodos cargados de esporas entran a la raíz de una planta hospedante y comienzan a alimentarse. La infección ocurre aproximadamente ocho días después, cuando algunas esporas germinan y penetran la cutícula. Luego que el tejido hipodermal del nematodo ha sido penetrado, el tubo germinal desarrolla una colonia vegetativa esférica que consiste de un micelio dicotómico septado y ramificado, se forman micro colonias que se dividen

y forman colonias hermanas. El proceso descrito continúa hasta formar grandes cantidades de colonias. A medida que ocurre el desarrollo, dichas colonias disminuyen, pero con un mayor tamaño, hasta que finalmente predominan los cuartos y luego las mitades del esporangio en desarrollo, dando lugar luego a un solo esporangio en el cual se forma una sola endospora. Luego se desarrolla un septum en la región anterior de la célula madre de la espora. El protoplasma en esa región se condensa para producir una espora anterior, con multicepas colocadas a su alrededor. El resultado final del proceso de infección es que la alimentación, muda y crecimiento del nematodo hospedero continúa normalmente, pero su capacidad reproductiva es destruida (Stirling 1991).

#### 2.4.4.3 Especificidad de huésped

Los estudios realizados hasta la actualidad indican que las endosporas de *P. penetrans* se adhieren solo a los nematodos y no a otros organismos del suelo. Se han reportado como hospederos de la bacteria a 200 especies de unos 100 géneros (Sayre y Starr 1988).

Según Stirling (1991) muchos trabajos realizados para conocer la especificidad de *P. penetrans* se han tomado de poblaciones no homogéneas de la bacteria y no han partido de una sola espora. Por lo tanto es difícil conocer la verdadera especificidad ya que en el campo hay mucha variabilidad.

Se ha probado cierto grado de especificidad entre *P. penetrans* y algunos géneros de nematodos; por ejemplo, esporas extraídas de *M. incognita* y *P. brachyurus* se adhieren solo a *Meloidogyne* spp. y *P. brachyurus* (Dutky y Sayre 1978)

Davies *et al* (1991) sugieren que las proteínas en la superficie de la espora podrían estar involucradas. Por lo tanto, la diferencia entre poblaciones en la especificidad de adherencia pueden estar causando diferencias cuantitativas y cualitativas; por ello, sería pertinente emplear técnicas de genética molecular a *Pasteuria* para entender su variabilidad genética.

Entre los atributos que tiene *P. penetrans* como agente biocontrolador están su especificidad de blanco (parásito obligado), su resistencia al calor y a la desecación, su tolerancia a los pesticidas y

además la característica de no ser nocivo para el usuario (Channer y Gowen 1988).

Estudios realizados por Stirling *et al.* (1990) con diferentes concentraciones de esporas a una temperatura de  $27 \pm 1$  °C sobre el número de las mismas adheridas a juveniles (J2) de *M. javanica*, encontraron que después de un día, la cantidad de esporas adheridas a los nematodos fue de 25 o más por juvenil. Además, se encontró un incremento en el número de esporas adheridas conforme se aumentó la concentración y el tiempo de exposición entre la bacteria y *M. javanica*.

La presencia de esporas adheridas a la cutícula de los nematodos no indica que éstos estén infestados; la infección se manifiesta por la ausencia de masas de huevos en hembras maduras y por la presencia de esporas de *P. penetrans* (Stirling 1991).

Se necesitan únicamente cinco esporas adheridas a la cutícula para que el nematodo sea infectado pero se necesita una mayor cantidad para que afecte la infectividad del nematodo a la planta (Stirling 1984).

Diferentes trabajos han mostrado que la infectividad de nematodos se reduce cuando tienen de 15 a 20 esporas adheridas, pero antes de poder observar reducciones marcadas en la infectividad se necesitan hasta 50 esporas (Brown y Smart 1985, Davies *et al.* 1988).

Estos mismos autores sugieren que para tener éxito en la estrategia de control mediante la inundación con *P. penetrans*, es necesario que la mayoría de nematodos en la vecindad de una planta sean infestados o cargados con suficientes esporas para promover la adherencia de esporas y asegurar que el parasitismo ocurra previniendo la invasión a las raíces.. Suponiendo que los juveniles normalmente duran 24 horas para moverse a través del suelo, antes de entrar a la raíz, se puede especular que las concentraciones necesarias serían de  $10^5$  y  $2.5 \times 10^5$  esporas/g de suelo, con una temperatura de 27 °C, esto para asegurar un promedio de cerca de 20 y 50 esporas adheridas a cada nematodo.

A mayores concentraciones de esporas ( $10^6$ /ml) por un período de 12 horas se incrementó la cantidad de esporas adheridas a la cutícula de *Meloidogyne incognita*. Períodos de exposición de 24 a 72 horas

ejercieron poco efecto en el número de esporas adheridas (Davies *et al.* 1988).

La eficiencia de *P. penetrans* para disminuir el porcentaje de agallamiento de *Meloidogyne javanica* se demostró en plantas de tomate (Daudi *et al.* 1990). La incorporación de preparaciones de raíces secas cargadas con esporas en suelo de campo a razón de 212-600 mg/kg de suelo redujeron el número de juveniles de *M. javanica* y el grado de agallamiento causado por el nematodo (Stirling 1984).

La reducción de un 48 a un 94% en la multiplicación de nematodos noduladores de la raíz se logró con tasas de aplicación de 250 y 1000 mg de polvo de esporas/kg de suelo (Raj y Mani 1988), en tanto que Dube y Smart (1987), disminuyeron el agallamiento e incrementaron el crecimiento de las plantas cuando aplicaron 500 mg/kg de suelo de un preparado de polvo de esporas.

#### 2.4.4.4 Forma de producir *P. penetrans*

El ciclo de vida de *P. penetrans* se desarrolla en sincronía con el nematodo nodulador de la raíz y con el completo desarrollo de las hembras parasitadas (Stirling 1991). Con el fin de optimizar la producción de *P. penetrans* Channer y Gowen (1988) propusieron la necesidad de infectar plantas hospederas con juveniles, que han sido expuestos previamente a esporas de *P. penetrans*. Según Stirling (1984), solo se necesitan cinco esporas para que el nematodo sea infestado. Las plantas hospederas deben estar en una etapa de crecimiento que suministre muchos sitios de invasión y lo suficientemente vigorosas para sostener la carga de nematodos parásitos por un período de 35 a 50 días después de la infección o invasión. Según el mismo autor, la cosecha o producción puede ser influenciada por la especie y la población del nematodo, la especie de planta hospedera, el sistema radical, el número de esporas y la adherencia al nematodo. Gowen y Channer (1988) aumentaron la producción de *P. penetrans* cuando mezclaron de 1000 a 5000 juveniles de *Meloidogyne incognita* en una suspensión de esporas de *P. penetrans*.

Stirling (1991) determinó que la temperatura tiene un efecto positivo en el número de esporas adheridas a la cutícula del nematodo, ya que la tasa de adherencia, a 27 °C es el doble de la observada a 18 °C. Otros trabajos realizados por Stirling (1991) demuestran que la patogenicidad de la bacteria es mayor cuando la temperatura se aumenta hasta 30 °C y se pierde un poco cuando disminuye a 20 °C, ya que las hembras generalmente desarrollan ovarios con huevos antes que la bacteria actúe.

### III. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1 Localización de los Experimentos

El trabajo de investigación se realizó en el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica, bajo condiciones de laboratorio y de invernadero.

#### 3.2 Adherencia de esporas de *P. penetrans* en segundos estados juveniles (J2) de *M. arabicida* y *M. incognita*.

Para detectar la presencia de esporas adheridas a la cutícula del nematodo, se colocaron segundos estadios juveniles (J2), en una suspensión de esporas de *P. penetrans* a una concentración de  $10^6$  esporas/ml y una temperatura promedio de la suspensión de 28°C. Se tomaron muestras de 20 nematodos, cada dos horas por 24 horas, para contar el número de esporas adheridas/nematodo.

La observación se realizó bajo el microscopio de luz marca Micro Phot FX Nikon<sup>TM</sup> a 200X y el microscopio de barrido Hitachi S-570 de la Universidad de Costa Rica.

3.3 Efecto de *P. penetrans* en el desarrollo de *M. arabicida* y *M. incognita* en raíces de tomate, bajo condiciones de invernadero.

El suelo utilizado fue una mezcla de arena y suelo franco arenoso en una proporción de 1:3. Se esterilizó con calor a una temperatura promedio de 200 °C por un período de 12 h y se dejó reposar por 6 días antes de ser utilizado.

3.3.1 Plantas de prueba

Se emplearon plantas de tomate de la variedad Hyslip de la Casa Asgro, las cuales son susceptibles a las dos especies de nematodos en estudio. La edad de las plantas, al momento de aplicar los tratamientos, fue de 5 semanas. Estas permanecieron a una temperatura promedio de 26 °C aproximadamente durante 7 semanas. Durante todo el período de investigación se realizaron tres fertilizaciones foliares con el producto comercial Nitrofoska el cual contiene 10 N, 4F, 7 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 0.2 MgO, 0.8 S y micronutrientes 0.02%. Se realizó una fertilización al suelo con la fórmula 10-30-10, 1,0 g/planta para suplir las demandas de elementos esenciales. También se aplicó un insecticida Abamectina (Vertimec) para combatir la mosca blanca (*Bemisia tabaci*) y el minador *Keiferia lycopersicella*.

### 3.3.2 Fuente de inóculo de *M. arabicida* y *M. incognita*

Para obtener poblaciones homogéneas de los nematodos, estos se multiplicaron a partir de masas de huevos.

Con el fin de obtener poblaciones altas de *M. arabicida* se consideró el método propuesto por Calderón (1989) el cual considera la extracción de nematodos de raíces de café, infectadas naturalmente, para su posterior inoculación en las plantas de tomate.

El incremento de las poblaciones de las dos especies en estudio, permitió utilizar una cantidad de inóculo por maceta de 1000 juveniles y huevos, extraídos de las raíces por el método de hipoclorito de sodio (Ferris 1985).

### 3.3.3 Multiplicación de inóculo de *Pasteuria penetrans*

La metodología empleada consistió en mezclar los dos organismos en un vaso de precipitado con agua, incubándolos por 24 h con el fin de permitir que la bacteria se adheriera a los juveniles del nematodo

antes de infectar las plantas de tomate (Gowen y Ahmed 1990).

La cantidad de inóculo de *P. penetrans* empleada por maceta (unidad experimental) fue de  $2 \times 10^6$  esporas/ml.

#### 3.3.4 Nematicida empleado

El nematicida empleado fue Mocap 5G (ethoprop), el cual es ampliamente utilizado en agricultura y tiene un poder residual bajo (3 meses) comparado con otros que circulan en el mercado costarricense (Rojas 1989). La aplicación de éste producto fue en forma inundativa a 10 ppm. La preparación del ethoprop se realizó siguiendo la metodología que se detalla en el Anexo 1.

#### 3.3.5 Método de extracción y conteo de nematodos

El método de extracción de nematodos del suelo fue el de tamizado-centrifugado y flotación en solución azucarada (Jenkins 1964). Por medio de este método se contaron todos los nematodos del suelo.

El método utilizado para la extracción de nematodos en la raíz fue el de licuado y tamizado, se procesó toda la muestra de raíz y se hizo el conteo respectivo con ayuda de un microscopio estereoscópico.

### 3.3.6 Comprobación de la infección de *P. penetrans* en *M. arabicida* y *M. incognita*

La comprobación se hizo de acuerdo con el método recomendado por Stirling (1991), el cual consiste en recolectar 140 hembras maduras para cada una de las dos especies de *Meloidogyne*, mediante disecciones de raíces infectadas. Las hembras recolectadas son comprimidas mecánicamente en un porta objetos y cubre objetos, para observar bajo el microscopio de luz a 200X y verificar la presencia de esporas de *P. penetrans*.

### 3.3.7 Diseño Experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar con siete tratamientos y siete repeticiones donde la unidad experimental fueron las macetas, con una capacidad de 300 g de suelo estéril, sembrándose una planta por maceta. La duración del ensayo fue de siete

semanas después de la aplicación de los tratamientos.

### 3.3.8 Tratamientos

1. Testigo absoluto (sin nematodos)
2. *M. arabicida* solo
3. *M. incognita* solo
4. *M. arabicida* más Ethoprop a 10 ppm
5. *M. incognita* más Etroprop a 10 ppm
6. *M. arabicida* más *P. penetrans*
7. *M. incognita* más *P. penetrans*

### 3.3.9 Variables a medir

1. Porcentaje e índice de agallamiento (escala de evaluación propuesta por Barker 1987), anexo 2. Los datos fueron transformados a  $\sqrt{x + 0.5}$ .
2. Peso fresco y seco de la parte aérea de la planta.
3. Peso fresco de la raíz

4. Población final de raíz y suelo. Datos transformados a  $\sqrt{x + 0.5}$ .
5. Observación y cuantificación de juveniles libres de esporas y juveniles en el suelo con esporas adheridas en su cutícula al finalizar el ensayo.
6. Verificación de la patogenicidad de *P. penetrans* en las dos especies de *Meloidogyne* por medio de la disección de raíces y extracción de las hembras maduras de los nematodos.
7. Tasa de multiplicación del nematodo. Para esta variable se toma la población total final tanto en suelo como en raíz y se divide entre la población inicial (1000 huevos juveniles), quedando la fórmula  $P_t/P_i$ . Datos transformados a  $\sqrt{x + 0.5}$ .

#### 3.4 Estudios Histológicos

Se tomaron raíces agalladas provenientes de los tratamientos de *Meloidogyne* spp. - *Pasteuria*. Estas fueron fijadas en FAA (alcohol, agua destilada, formalina y ácido acético) durante 48 h y

deshidratadas en una serie ascendente de alcohol (50-100-100°) (Anexo 3).

Una parte de estas muestras se infiltró en paraplast-plus y la otra se infiltró en historesina (Anexo 4). Las raíces infiltradas en parafina se seccionaron a 8 µm de grosor, utilizando para ello un micrótopo de rotación. Los cortes se colocaron sobre porta objetos y se tiñeron con la técnica de safranina - Fast Green y la técnica de cuádruple coloración (CIRAD, 1989). Finalmente se observaron al microscopio de luz.

Las muestras infiltradas en resina, se cortaron a 2-3 µm de grosor utilizando un micrótopo Sorvall. Los cortes se colocaron sobre porta objetos y se tiñeron con azul de toluidina. Estos fueron posteriormente observados bajo el microscopio de luz, marca Nikon, Microphot FX.

### 3.5 Aplicación de diferentes técnicas para la comprobación de adherencia

Nematodos previamente inoculados con *P. penetrans* fueron teñidos con diferentes colorantes con el fin de encontrar aquel que permitiera una mejor

observación de las esporas, tanto sobre la cutícula de juveniles (J2), como dentro de hembras maduras de las especies en estudio.

De esta manera, se hicieron tinciones con safranina al 1%, con acridina orange al 0.1 g/100 H<sub>2</sub>O destilada (solución madre), con DAPI 1 mg/1ml H<sub>2</sub>O destilada (solución madre) y con Cotton blue (CIRAD 1989). También se probó con la técnica de contraste de fases.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Adherencia de *P. penetrans* a juveniles (J2) de *M. arabicida* y *M. incognita* a través del tiempo

El porcentaje de nematodos con esporas y el número de esporas de *P. penetrans* adheridas a la cutícula de juveniles (J2) de *M. arabicida* y *M. incognita* se incrementó conforme se aumentó el tiempo de exposición entre la bacteria y los nematodos (Figs. 1, 2). A las 24 h, el promedio de esporas adheridas a la cutícula de *M. incognita* fue de 8, y el porcentaje infestado con *P. penetrans* fue de 95%. El promedio de esporas adheridas para *M. arabicida* fue de 4, con un 70% de J2 con *P. penetrans*.

Existieron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en la cantidad de esporas adheridas a la cutícula de las dos especies de nematodos en estudio. Estos resultados permiten suponer que la bacteria es más específica par *M. incognita* que para *M. arabicida*.

Con los promedios obtenidos es muy probable que pueda ocurrir la infección de *P. penetrans* a los nematodos estudiados (Fig. 1). No obstante, Stirling (1984) estableció que cinco esporas por

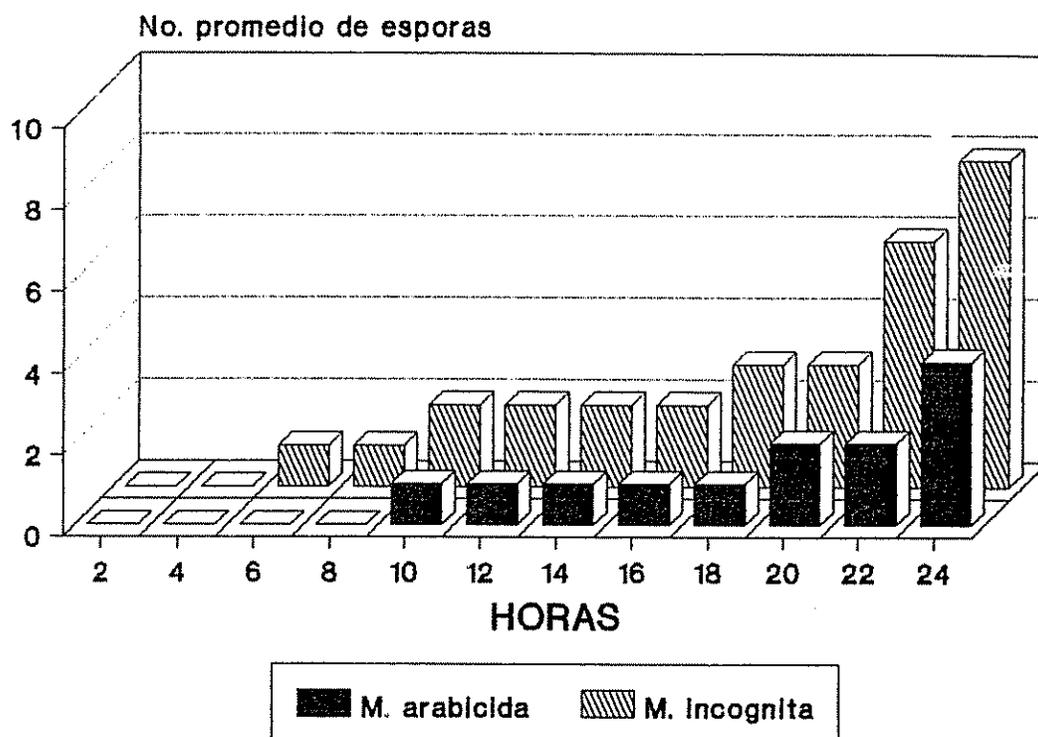


Figura 1. Número promedio de esporas de *P. penetrans* adheridas a la cutícula de J2 de *M. arabicida* y *M. incognita* en función del tiempo (h).

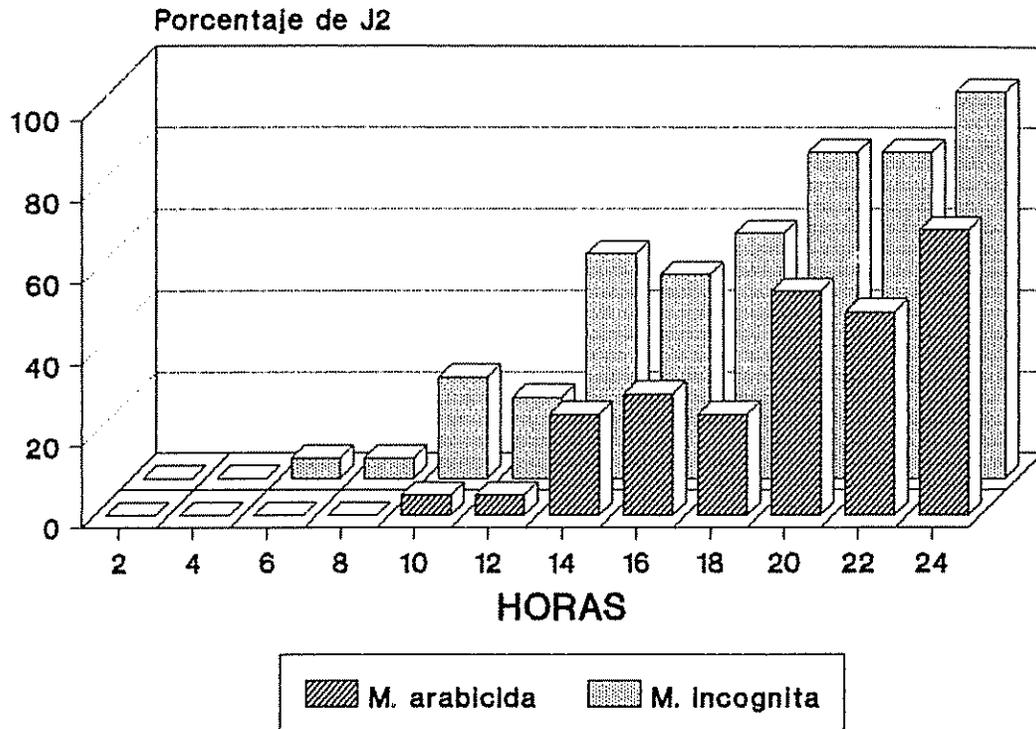


Figura 2. Porcentaje de J2 de *M. arabicida* y *M. incognita* con *P. penetrans* adherida a su cutícula en función del tiempo (h).

nematodo eran suficientes para asegurar la infección aunque se requiere un número mayor de esporas para afectar la infectividad del nematodo a las plantas.

En el caso de la especificidad de *P. penetrans*, Kerry (1988) afirma que hay un amplio ámbito de adherencia a la cutícula de fitonematodos, pero las poblaciones de la bacteria, por lo general, son altamente específicas. Diferentes poblaciones de la misma especie de nematodos pueden variar considerablemente en su susceptibilidad. Dutky y Sayre (1978) probaron la especificidad de *P. penetrans*; así, las esporas extraídas de *M. incognita* y *Pratylenchus brachyurus* se adhirieron únicamente a *Meloidogyne* y a *Pratylenchus*.

Observaciones realizadas al microscopio electrónico de barrido mostraron que no hay una preferencia de la bacteria hacia alguna región del cuerpo de *M. arabicida* y *M. incognita*, encontrándose inclusive, esporas adheridas a las bandas laterales. Las esporas de *P. penetrans* tienen forma de disco con la parte central abultada (Fig. 3 y 4). Cuando las endoesporas maduras son producidas, están rodeadas por una pared esporangial y un exosporio delgado (Stirling 1991 y Giblin-Davis *et al.* 1990).

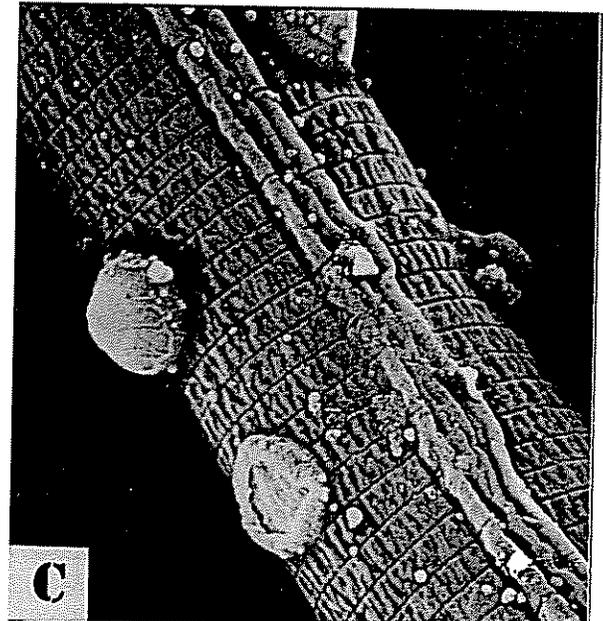
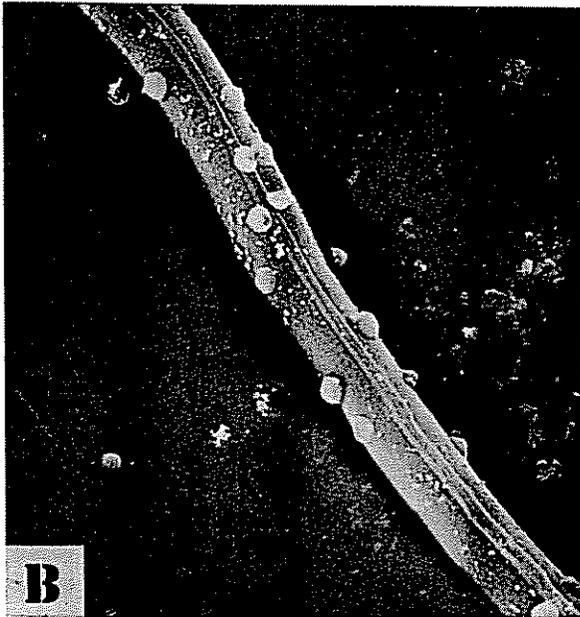
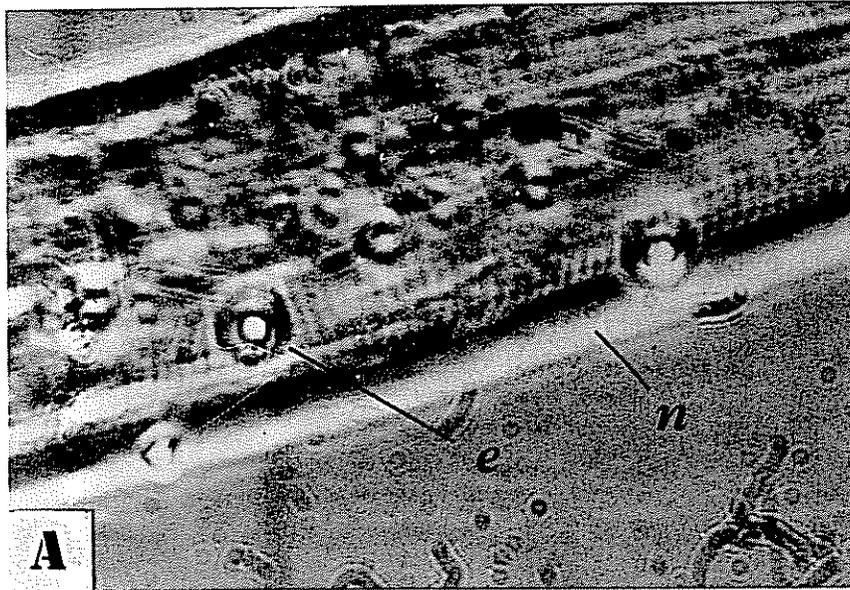


Figura 3. Endosporas de *P. penetrans* atacando la cutícula de J2 en *M. incognita*. A: Fotografía microscopio de luz mostrando esporas de *P. penetrans* (e: esporas, n: nematodo) (200X), B,C: Parte media de J2 con esporas de *P. penetrans* (e: esporas, n: nematodos) (1300X y 6000X)

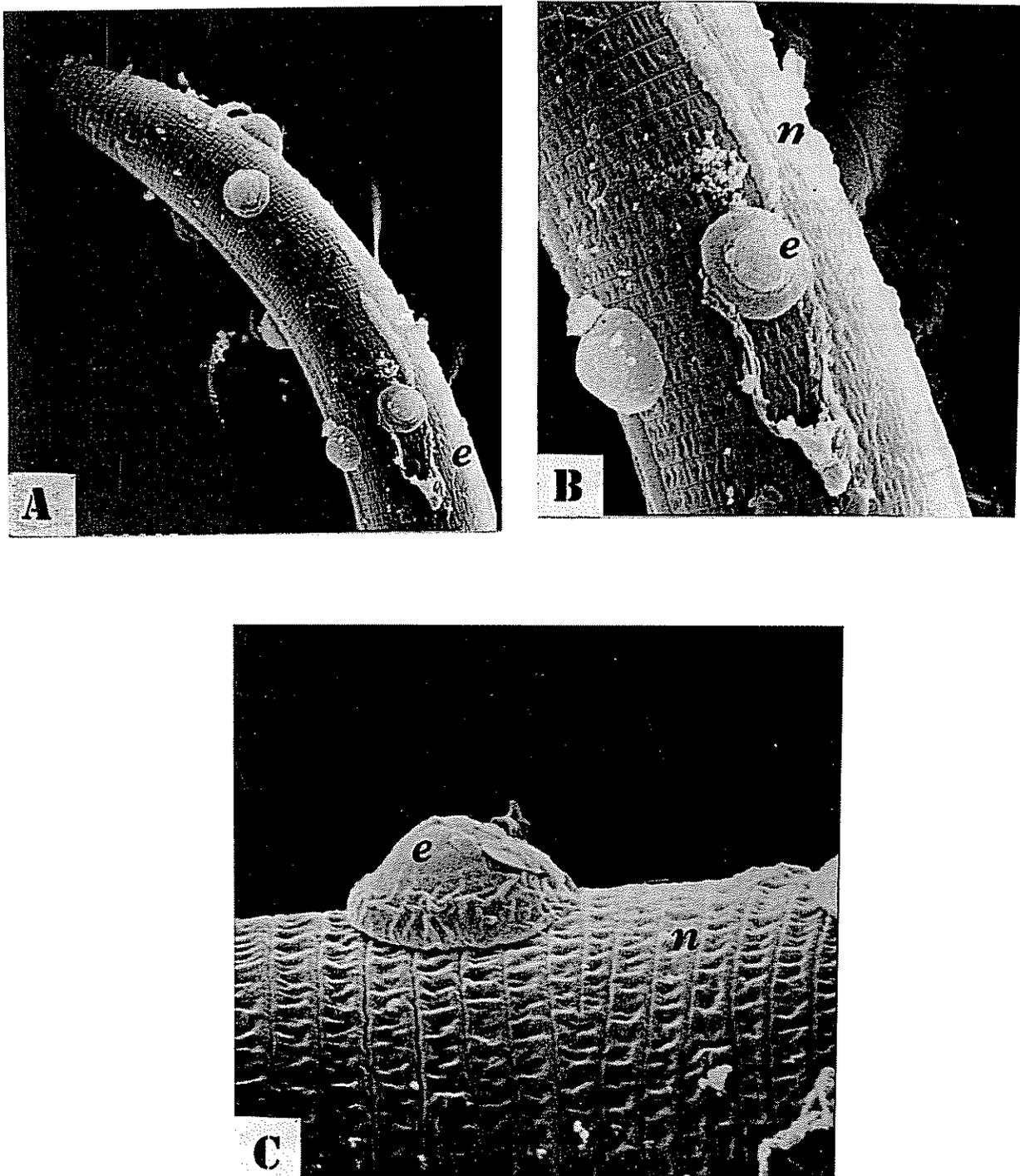


Figura 4. Endosporas de *P. penetrans* atacando la cutícula de J2 en *M. arabicida*. A: Porción anterior del J2 mostrando un gran número de esporas (e: esporas de *P. penetrans*; n: nematodo) (3000X). B,C: Esporas adheridas a la región central del cuerpo del nematodo (7000X)

4.2 Efecto de *P. penetrans* en el desarrollo de *M. arabicida* y *M. incognita* en raíces de tomate bajo condiciones de invernadero.

4.2.1 Porcentaje de agallamiento

Se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ), en los porcentajes de agallamiento para los diferentes tratamientos (Cuadro 1).

Como se observa, hay una marcada reducción en el porcentaje de agallamiento radical entre los tratamientos con *M. incognita* solo y *M. arabicida* solo, en comparación con los tratamientos *M. incognita* + *P. penetrans* ó *M. arabicida* + *P. penetrans*. Esto indica que *P. penetrans* afecta a ambas poblaciones de nematodos agalladores y en consecuencia sugiere cierto grado de potencialidad como agente biocontrolador.

Resultados similares obtuvo Stirling (1984) quien redujo significativamente el grado de agallamiento cuando incorporó preparados de raíces secas cargadas

Cuadro 1. Porcentaje de agallamiento en plantas de tomate para los diferentes tratamientos provocados por *M. arabicida* y *M. incognita*

Tratamientos	Promedio % agallamiento**	Porcentaje de reducción
<i>M. incognita</i>	97.4 a*	--
<i>M. arabicida</i>	82.86 a	--
<i>M. incognita</i> + <i>P. penetrans</i>	53.33 b	44.1
<i>M. arabicida</i> + <i>P. penetrans</i>	46.43 b	36.5
<i>M. incognita</i> + Ethoprop	16.93 c	80.5
<i>M. arabicida</i> + Ethoprop	2.86 c	83.0
Testigo	0.00	

\* Promedios seguidos por letras iguales no son significativamente diferentes según la prueba Duncan con alfa = 0.05

\*\* De acuerdo a escala de Barker 1987.

de esporas en campos infestados con *M. javanica*. Dube y Smart (1987) disminuyeron el agallamiento con 500 mg de polvo de raíces molidas cargadas con esporas. Al comparar el grupo dos (nematodos + bacteria) y el grupo tres (nematodos + nematicida) la reducción del agallamiento fue en promedio de un 40% a favor del nematicida.

Trabajos realizados por Marban y Viglierchio (1980) mostraron que los nematicidas ejercen un efecto inmediato sobre los nematodos, siempre y cuando estén expuestos al intoxicante. Dependiendo de la dosis, el efecto puede ser visible como la inmovilización o no serlo como el efecto sobre la atracción o eclosión. Sin embargo, al liberarse el nematodo del efecto del toxicante éste se recupera totalmente.

Esto explica en parte la existencia de agallamiento en plantas de tomate de nuestro ensayo a la dosis de ethotrop utilizada y bajo las condiciones descritas.

En Costa Rica este producto a la dosis de 30 g/planta redujo las poblaciones de *M. incognita* en el cultivo de pimiento. Sin embargo, luego de tres meses su efecto pasó y las poblaciones de este nematodo aumentaron significativamente (Rojas 1989).

El hecho de que *P. penetrans* por sí solo haya protegido al tomate del agallamiento por ambas especies en aproximadamente el 40% en relación al testigo inoculado con nematodos, nos permite también sugerir la conveniencia de explorar para el futuro la posibilidad de utilizar a la bacteria en combinación con productos químicos. Ya existen reportes en la literatura donde se ha medido el efecto combinado de nematicidad + *P. penetrans* contra el efecto solo de dichas tácticas y los resultados han sido promisorios (Daudi, *et al.* 1990).

Nosotros consideramos que bajo las condiciones del trópico, particularmente en cultivos afectados por nematodos agalladores, esta opción debe explorarse para el futuro pues por sí misma constituye una opción al uso de nematicida.

#### 4.2.2 Población final en raíces de tomate de *M. incognita* y *M. arabicida* y su tasa de multiplicación

Se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ( $P < 0.05$ ). Cuando se evaluó la población final en raíces y tasa de multiplicación, *M. incognita* obtuvo la mayor población con un

promedio de 5531 juveniles (J2) y una tasa de multiplicación de 6.19; en el caso de *M. arabicida* la población final fue de 2766 juveniles con una tasa de multiplicación de 3.59 (Cuadro 2).

La capacidad de incremento poblacional en las dos especies de nematodos estudiados se vio reducida, en un 67% cuando se aplicó *P. penetrans* y en un 93% cuando se aplicó nematicida, reflejándose lo anterior en las tasas de multiplicación de los nematodos. Al comparar el efecto del ethoprop sobre las poblaciones de *M. incognita* y *M. arabicida* contra el efecto de *P. penetrans* sobre los mismos nematodos se observó que las tasas de multiplicación son menores para ethoprop (Cuadro 2).

Se debe entender que los organismos antagonistas de los nematodos fitoparásitos requieren una serie de condiciones para actuar eficientemente, ya que existen diferentes factores que pueden influir directa e indirectamente en el potencial de control Stirling (1991), aunado al hecho de que la disminución que ejercen estos organismos antagonistas a fitonematodos es de generación a generación. Por el contrario, los nematicidas ejercen un efecto detrimental inmediato sobre los

Cuadro 2. Promedio poblacional de *M. incognita* y *M. arabicida* en raíces de tomate y su tasa de multiplicación

Tratamientos	Población final	Tasa de multiplicación	% reducción
<i>M. incognita</i>	5531.3 a*	6.19 a	--
<i>M. arabicida</i>	2766.4 b	3.59 b	--
<i>M. incognita</i> + <i>P. penetrans</i>	1365.0 c	1.78 c	71.2
<i>M. arabicida</i> + <i>P. penetrans</i>	1136.0 c	1.33 c d	62.9
<i>M. incognita</i> + Ethoprop	302.1 d	0.52 d e	91.6
<i>M. arabicida</i> + Ethoprop	113.6 d	0.19 e	94.7
Testigo	0.0 d	0.00 e	

\* Promedios seguidos por letras iguales no son significativamente diferentes según la prueba de Duncan con alfa = 0.05

nematodos (Marbán 1985). Es por eso que se encontró diferencias muy marcadas en las poblaciones finales y tasas de multiplicación entre los tratamientos con nematicida y *P. penetrans* (Cuadro 2). Aunque existen éstas diferencias, es evidente que existe efecto biocontrolador de nematodos con *P. penetrans*.

Estudios realizados por Bird y Brisbane (1988), en plantas de tomate, informan que la capacidad reproductiva de los nematodos fue mucho menor en suelos infestados con *P. penetrans* que en suelos no infestados. Raj y Mani (1988) obtuvieron reducciones de un 48 a 94% en la multiplicación de nematodos noduladores de raíz con tasas de aplicación de polvo de esporas de 250 y 1000 mg.

Las pérdidas causadas por *M. incognita* de 23-25% en los cultivos de tabaco, frijol soya y arveja se redujeron cuando se incorporó al suelo *P. penetrans* (Brown y Smart 1985).

#### 4.2.3 Patogenicidad de *P. penetrans* en *M. incognita* y *M. arabicida*

Se encontró un 45% de *M. incognita* y un 30% de *M. arabicida* parasitados con *P. penetrans* (Cuadro 3).

Cuadro 3: Número promedio de hembras maduras de *M. arabicida* y *M. incognita* parasitadas y sanas con *P. penetrans*

Espece de nematodo	Sanas	Enfermas	(%) hembras enfermas
<i>Meloidogyne arabicida</i>	94	46	32
<i>Meloidogyne incognita</i>	77	63	45

Esto nos permite inferir que *P. penetrans* es más específico para *M. incognita*, corroborando los resultados obtenidos en el experimento de adherencia. En las hembras parasitadas de ambas especies, se observó la presencia de endosporas de la bacteria y la ausencia de masas de huevos (Fig. 5).

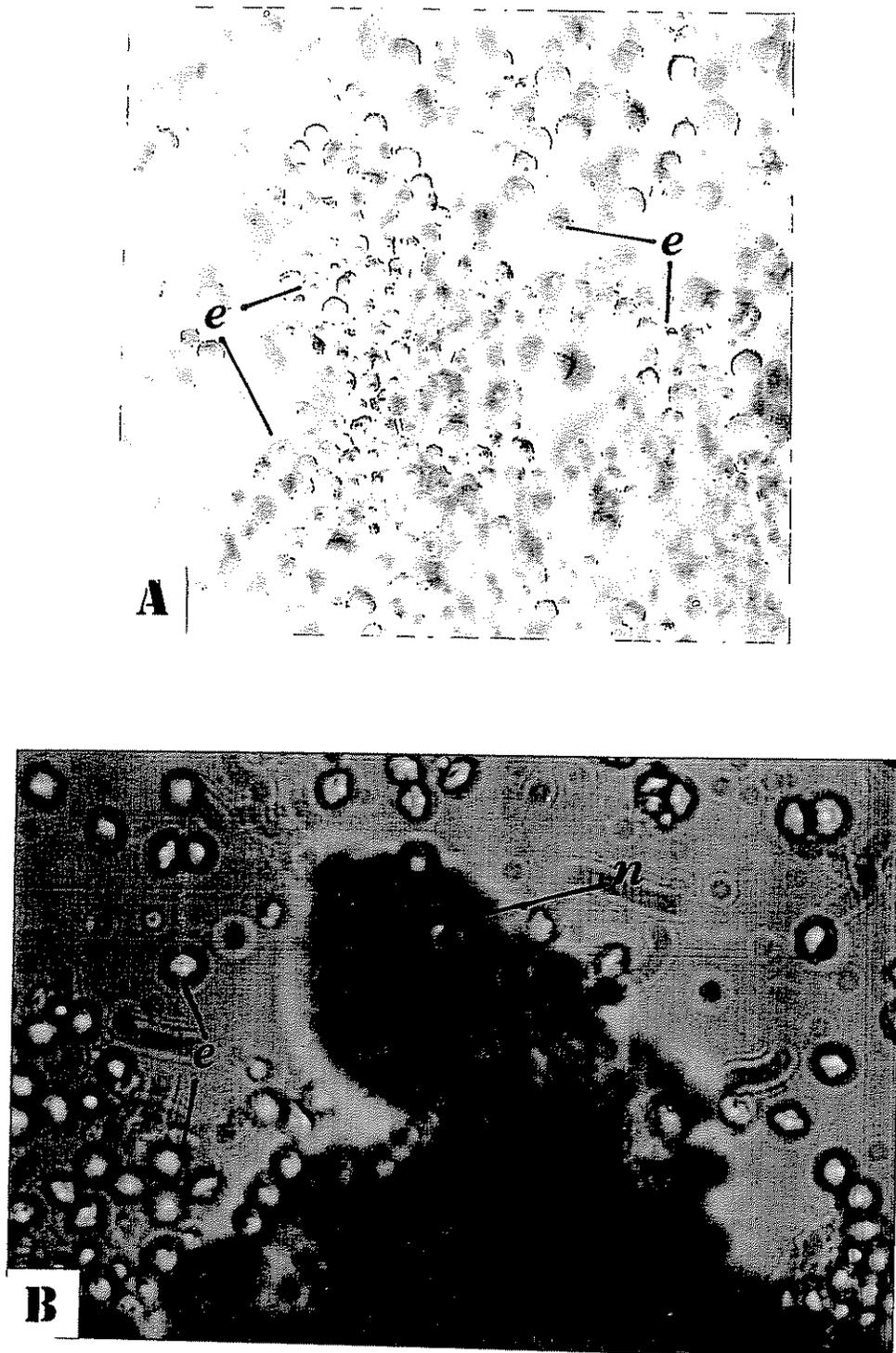


Figura 5. Esporas de *P. penetrans* liberadas del cuerpo de *Meloidogyne* A: Esporas de *P. penetrans* extraídas de *M. incognita* (e: esporas) (200X). B: Esporas de la bacteria obtenidas de *M. arabicida* (e: esporas; n: nematodo) (200X).

Los resultados obtenidos en el porcentaje de parasitismo, la ausencia de masas de huevos y la presencia de endosporas dentro de los nematodos, son criterios que permiten considerar a *P. penetrans* como un buen agente biocontrolador de nematodos.

La única manera de determinar la presencia de endosporas de *P. penetrans* y la ausencia de masas de huevos es mediante la disección de raíces para extracción de hembras maduras de *Meloidogyne* y comprimirlas contra un porta objetos (Stirling 1991, Mankau 1975).

#### 4.2.4 Población final de nematodos en el suelo

Se observaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en las poblaciones finales de nematodos en el suelo (Cuadro 4), encontrándose las poblaciones más altas, en *M. incognita* tratadas con *P. penetrans* y nematicida como en ausencia del tratamiento.

Al analizar el número de juveniles que presentan esporas de *P. penetrans* adheridas a su cutícula, se encontró diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) para las dos especies de nematodos estudiadas, donde *M. incognita* presentó 214 juveniles con esporas para un

Cuadro 4: Promedio poblacional de *M. arabicida* y *M. incognita* en 300 gr de suelo, número de juveniles (J2) con *P. penetrans* adheridas y su porcentaje

Tratamiento	Promedio		Número de juveniles con con <i>P. penetrans</i>	(%) de adherencia
<i>M. incognita</i>	677.6	a*		
<i>M. arabicida</i>	550.3	a		
<i>M. incognita</i> + <i>P. penetrans</i>	418.9	a b	214 a	51
<i>M. arabicida</i> + <i>P. penetrans</i>	223.7	b c	51 b	22.8
<i>M. incognita</i> + Ethoprop	211.5	b c		
<i>M. arabicida</i> + Ethoprop	78.1	c		
Testigo absoluto	0.0	d		

\* Promedios seguidos por letras iguales no son significativamente diferentes según la prueba de Duncan con alfa = 0.05

51% y en *M. arabicida* se contaron 51 J2 con esporas para un 22.8% (Cuadro 4). Estos resultados son consistentes con los datos obtenidos en las pruebas de patogenicidad, porcentaje de agallamiento y poblaciones finales en raíces en el sentido de que el material utilizado de *P. penetrans* es más específico para *M. incognita* que para *M. arabicida*.

La eficiencia de la bacteria depende en gran medida de la cantidad de esporas existentes en el suelo que puedan parasitar las siguientes generaciones del nematodo nodulador de la raíz. Según Mankau (1980), este parasitismo es tan efectivo en macetas que pueden exterminar una población al cabo de 4 a 5 generaciones. Hay una disminución significativa en la reproducción de los nematodos agalladores de la raíz cuando las esporas de *P. penetrans* son mezcladas al suelo; a esto se debe el gran potencial de la bacteria como agente controlador de fitonematodos ya que puede disminuir la patogenicidad de los J2 según la cantidad de esporas adherida a su cutícula, prevenir la reproducción y en consecuencia influir el desarrollo poblacional de futuras generaciones (Gowen y Channer 1988).

#### 4.2.5 Peso fresco y seco de follaje y raíces en las plantas de tomate bajo los distintos tratamientos

Se determinaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) para las variables de peso seco y fresco de follaje y de raíces (Cuadro 5). El tratamiento con menor peso de follaje fresco fue el de *M. incognita* con 5.20 g, causando una reducción de biomasa de 57.89%, en comparación con el testigo absoluto. El mayor peso de follaje seco se obtuvo en el testigo con 1.47 g y el menor fue para *M. incognita* con 0.61g, con una reducción comparativa de 58.50%. No se determinaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre *M. arabicida* y el testigo. Esto puede deberse a que la bacteria no tenga virulencia a esta especie comparada con *M. incognita* o a que las condiciones experimentales no fueron apropiadas para comparar el efecto.

Sin embargo, los resultados mencionados sugieren que hubo un mayor efecto detrimental en la producción de biomasa, confirmando la especificidad de *M. incognita* para plantas hospedantes como tomate con respecto a otras especies de nematodos agalladores (Hadisoeganda y Sasser 1982, Aguilar 1993).

Cuadro 5. Peso fresco y seco del follaje y raíces en las plantas de tomate, bajo los diferentes tratamientos.

Tratamientos	Peso fresco		Peso seco		Peso fresco		Peso seco	
	follaje (g)	% reducción	follaje (g)	% reducción	raíz (g)	% reducción	raíz (g)	% reducción
Testigo absoluto	12.35a*	--	1.47a	--	2.42 b	44.36		
M. arabicida + P. penetrans	10.68ab	13.52	1.45a	1.36	4.35a	--		
M. arabicida	8.60 bc	30.36	1.05abc	28.57	4.14a	4.82		
M. incognita + Ethoprop	8.48 bc	31.33	1.15ab	21.76	2.48 b	42.98		
M. arabicida + Ethoprop	6.32 cd	48.82	0.95 bc	35.57	1.95 b	55.17		
M. incognita + P. penetrans	6.16 cd	50.12	0.71 bc	51.70	2.06 b	52.64		
M. incognita	5.20 d	57.89	0.61 c	58.50	2.45 b	43.67		

\* Promedios seguidos por letras iguales no son significativamente diferentes según la prueba de Duncan con  $\alpha = 0.05$

El ethoprop redujo sustancialmente las poblaciones de los nematodos, pero presumiblemente la dosis empleada provocó una alteración en la fisiología y metabolismo de las raíces, lo cual se refleja en el peso fresco de las mismas (Cuadro 5).

#### 4.3. Cortes histológicos

Los cortes histológicos, tratados con parafina o resina, permitieron observar que ambas especies de nematodos inducen la formación de gran cantidad de células gigantes localizadas cerca y dentro del tejido vascular. Además se observó un desarrollo mayor en células vecinas y una gran cantidad de núcleos en su interior (Fig. 7). Es muy frecuente observar la presencia de nematodos dentro del tejido cortical y algunos de ellos con esporas de *P. penetrans* dentro de su cuerpo. Rohde y McClure (1975), encontraron células gigantes que aparentemente se formaron por la disolución de la pared celular, dando como resultado una unión de células adyacentes, una serie de divisiones endomitóticas sincronizadas y agrandamiento de los núcleos y nucleolos de las células. Las células periféricas a las células gigantes se dividieron y

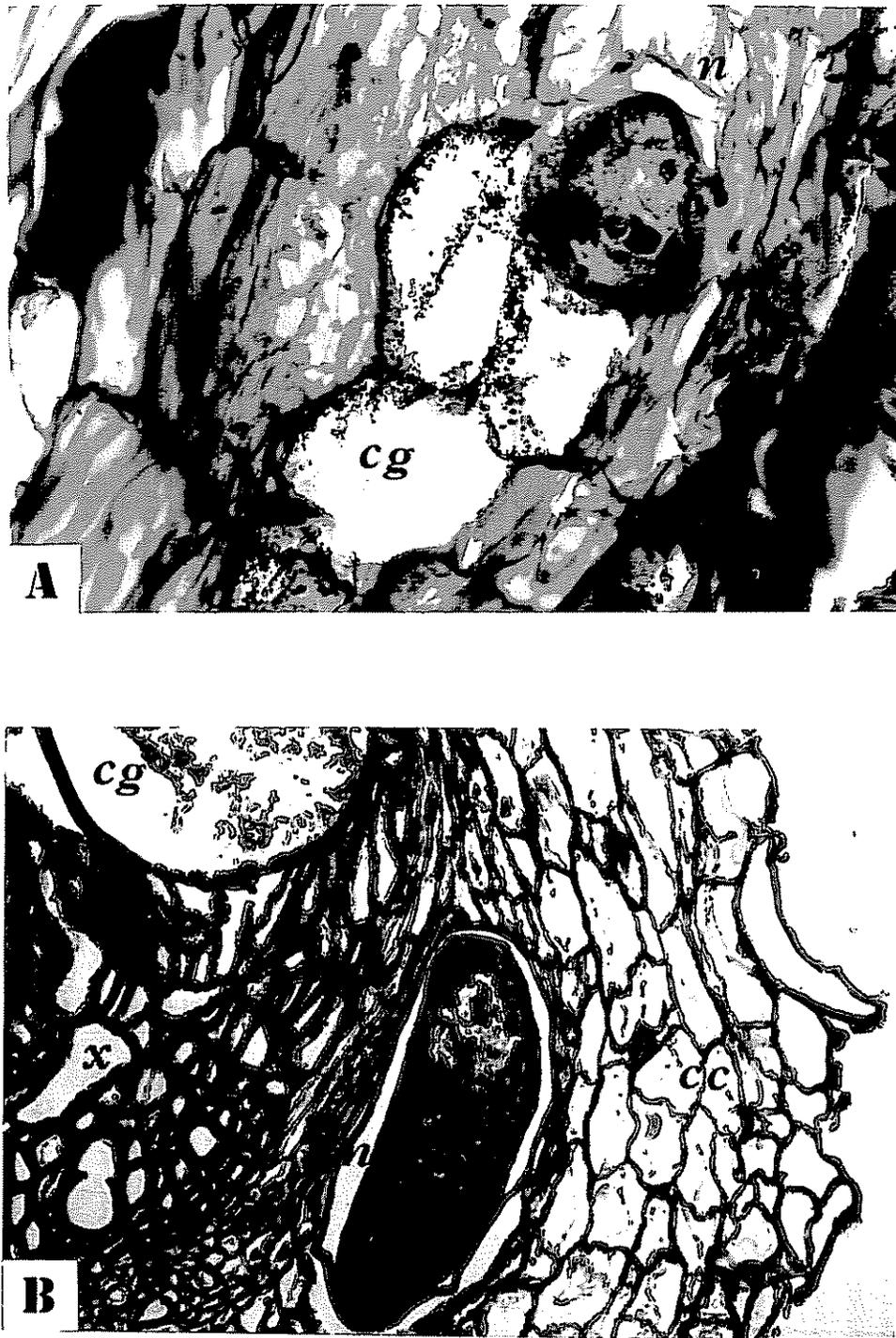


Figura 6: Secciones transversales de raíz donde se observa la hembra de *Meloidogyne*, así como la formación de células gigantes. A: Raíz infiltrada en parafina (n: nematodo; cg: célula gigante) (40X), B: Raíz infiltrada en resina (n: nematodo, cg: células gigantes, cc: células corticales, x: xilema) (20 X).

formaron un círculo distintivo de células pequeñas (Taylor y Sasser 1985).

### Técnicas de coloración

No todas las técnicas probadas dieron los resultados esperados.

Así, las técnicas de coloración con safranina, Cotton Blue, DAPI y contraste de fases, presentaron el inconveniente de que toda la muestra tomó la misma tonalidad, por lo que no fue fácil diferenciar a la bacteria.

La técnica de tinción con "Acridin Orange" fue la que dio mejores resultados, ya que algunos de los contenidos del nematodo tiñeron en azul-turquesa, contrastándose con el color naranja adquirido por las esporas de *P. penetrans* (Fig. 7).

Otra técnica que brindó resultados satisfactorios fue la de regulación de la entrada de luz por medio de la colocación del condensador a diferentes alturas. Utilizando este método, se apreció muy bien la bacteria sobre la cutícula del nematodo.

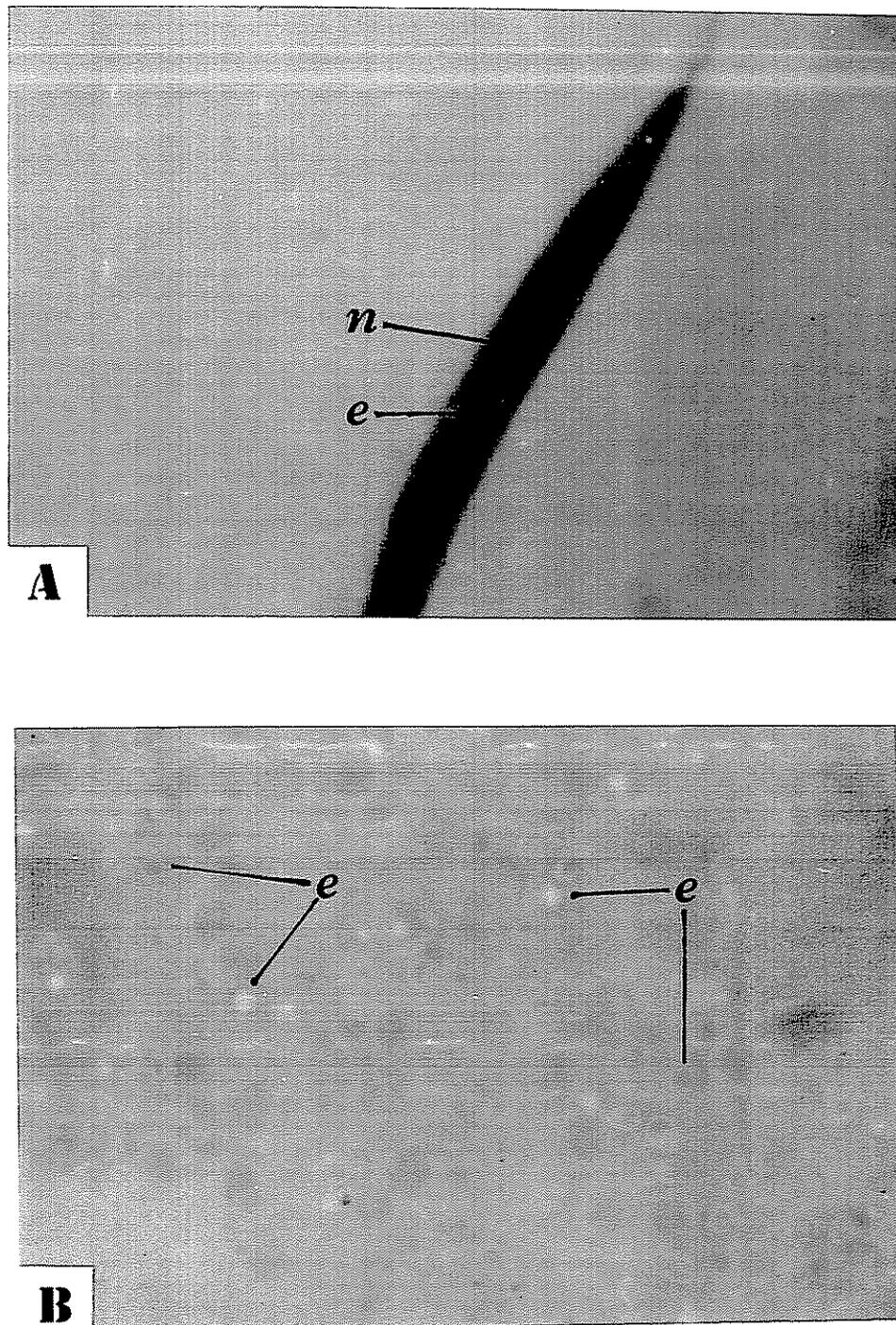


Figura 7: Esporas de *P. penetrans* teñidas con acridin orange. A: Esporas adheridas a la cutícula de un J2 (e: esporas; n: nematodo)(200X) B: Esporas liberadas del cuerpo de un nematodo (e: esporas)(200X).

## V. CONCLUSIONES

Se confirmó la adherencia de *P. penetrans* a la cutícula de J2 de *M. incognita* y *M. arabicida*, con un promedio de 8 esporas para el primero y 4 para el segundo, encontrándose una evidente preferencia de la bacteria a *M. incognita*. En este nematodo se registró un mayor porcentaje de J2 con esporas y mayor cantidad de esporas por J2.

El ethoprop 5G provocó una reducción del 80% en el porcentaje de agallamiento para *M. incognita* y de un 83% para *M. arabicida*. La reducción en el porcentaje de agallamiento, provocado por *P. penetrans* fue de un 44.1% para *M. incognita* y de un 37% para *M. arabicida*.

La reducción en la tasa de multiplicación para *M. incognita*, por medio de *P. penetrans* fue de 71% comparada con su testigo y para *M. arabicida* fue de 63%. El nematicida disminuyó la tasa de multiplicación para *M. incognita* en 92% y para *M. arabicida* en un 95%.

En la población final del suelo se determinó un 51% de J2 con esporas de *P. penetrans* adheridas y un 23% para *M. arabicida*, asegurando así el parasitismo de las siguientes generaciones.

La patogenicidad de *P. penetrans* fue mayor en *M. incognita*, con 45% de hembras parasitadas, que en *M. arabicida* en la cual se obtuvo un 30%.

Los nematodos provocaron daños severos en las raíces, induciendo la formación de células gigantes y alteraciones a nivel citoplásmico.

La técnica de tinción para la bacteria, que dio mejores resultados fue la de "Acridin Orange".

## VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar estudios tendientes a la combinación de *P. penetrans* con diferentes nematicidas para tener un panorama más amplio en cuanto al manejo integrado de los nematodos.
- Se sugiere realizar estudios a nivel de invernadero y campo, para conocer mejor el comportamiento de la bacteria bajo diferentes condiciones de clima, cultivos, suelos y hospederos.

Se recomienda estudiar, a nivel de campo, el efecto de residualidad de la bacteria sobre las poblaciones de nematodos.

## VII. BIBLIOGRAFIA

- AGUILAR, J.A. 1993. Evaluación de nematicidas, enmiendas orgánicas y resistencia varietal al nematodo agallador (*Meloidogyne salasi*, López) en el cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.) en Panamá. Tesis Mag. Sc. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 110 p.
- ATKINSON, G.F. 1892. Some diseases of cotton. Alabama Polytech. Inst. Agric. Expt. Sta. Bull. No. 41: 61-65. Citado por Jatala, P. 1982. Interrelaciones de los nematodos con otros organismos. Primer curso internacional de nematodo en papa. Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú. pág. 2.
- BELCHER, J.V. and R.S. HUSSEY. 1977. Influence of *Tagetes patula* and *Arachis hypogaea* on *Meloidogyne incognita*. Plant Dis. Repr. 61:525-528. Citado por Taylor, L.A. y Sasser, N.J. 1983. biología, identificación y control de los nematodos de nódulo de la raíz. Proyecto Internacional de *Meloidogyne*. Departamento de Fitopatología de la Universidad del Estado de Carolina del Norte. Pág. 91.
- BIRD, A.F., BRISBANE, P.G. 1988. The influence of *Pasteuria penetrans* in field soil and the reproduction of root-knot nematodes. Revue de Nematologie 11:75-81.
- BROWN, S.M. and SMART, G.C.Jr. (1985). Root penetration by *Meloidogyne incognita* juveniles infected with *Bacillus penetrans*. Journal of Nematology 17:123-126.
- BUNT, J.A. 1975. Effect and mode of action of some systemic nematicides. Meded. Landbouwhoges. Wageningen 75-10:1-27. Citado por Marban, N.M. 1985. Quimioterapia en nematodos. In Marban, N.M., Thomson, I.J. Fitonematología Avanzada I.
- CALDERON, V.M. 1989. Relación de diferentes genotipos de café a *Meloidogyne arabicida* López y Salazar (1989), gama de hospedantes y hongos fitopatógenos asociados. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica. CATIE. 71 p.

- CANTO, M. 1982. El género *Meloidogyne*. In Primer Curso Internacional de Nematodos de papa. s.p. CIP, Lima, Perú.
- CARTER, W. 1943. A promising new soil amendment and disinfectant. *Science*. 97:383-384.  
Citado por Rodríguez, K.R. 1991. Control biológico de nematodos parásitos de plantas. *Nematóptica* (U.S.A.) 21(1):111-122.
- CHANNER, A.G. and GOWEN, S.R. 1988. Preliminary studies on the potential of *Pasteuria penetrans* to control *Meloidogyne* species. Brighton Crop Protection Conference, Pests and Diseases. Pp. 1209-1214.
- CHITWOOD, B.G. 1949. Root-knot nematodes. I.A. revision of the genus *Meloidogyne* Goeldi 1887. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* 16:90-107.  
Citado por Taylor, L.A. y Sasser, N.J. 1983. biología, identificación y control de los nematodos de nódulo de la raíz. Proyecto Internacional de *Meloidogyne*. Departamento de Fitopatología de la Universidad del Estado de Carolina del Norte. Pág. 1.
- CHRISTIE, J.R. 1986. Nematodos de los vegetales, su control y ecología. México, Editorial Limusa. 275 p.
- DAUDI, A.T., CHANNER, A.G., AHMED, R., GOWEN, S.R. 1990. *Pasteuria penetrans* a biocontrol agent of *Meloidogyne javanica* in Malawi and in microplots in Pakistan. Brighton Crop Protection Conference, Pests and Diseases. Pp. 253-257.
- DAVIES, K.G., ROBINSON, M.P. and LAIRD, V. 1991. Proteins involved in the attachment of a hyperparasite, *Pasteuria penetrans*, to its plant parasitic nematode host, *Meloidogyne incognita*. *Journal of Invertebrate Pathology* (in press).
- DAVIES, K.G., KERRY, B.R. and FLYNN, C.A. 1988. Observations on the pathogenicity of *Pasteuria penetrans*, a parasite of root-knot nematodes. *Annals of Applied Biology* 112:491-501.

- DOMINGUEZ, V.J.A., MARBAN, M.V., DE LA CRUZ, R. 1990. Leguminosas de coberturas asociadas en tomate var. "Dina Guayabo" y su efecto sobre *Meloidogyne arabicida* López y Salazar. Turrialba (Costa Rica) 40(2):217-227.
- DUBE, B. and SMART, G.C. Jr. 1987. Biological control of *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* and *Pasteuria penetrans*. Journal of Nematology 19:222-227.
- DUTKY, E.M. and SAYRE, R.M. 1978. Some factors affecting infection of nematodes by the bacterial spore parasite *Bacillus penetrans*. Journal of Nematology 10:285.
- FERRIS, H. 1985. Modelos para la predicción de pérdidas en cosechas y decisiones en el manejo. In Zuckerman, M.B.; Mai, F.W. y Harrison, B.M. Manual de Laboratorio. Trad. al español por Marban, M.N. Centro de Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Montecillos, México. Publicado por CATIE, Turrialba, Costa Rica.
- FIGUEROA, A. 1974. Nematodos en café. Ministerio de Agricultura y Ganadería, Costa Rica. Boletín Técnico 61:90-100.
- \_\_\_\_\_. 1978. Efecto de Carbofurán 5G en la productividad del café Caturra. Sección Nematología, MAG, Costa Rica. Nematrópica Vol. 8. No. 2.
- GIBLIN-DAVIS, R.M., MCDANIEL L.L. and BILZ, F. 1990. Isolates of the *Pasteuria penetrans* Group from Phytoparasitic nematodes in Bermuda Grass turf. Supplement to Journal of Nematology 22(45):750-762.
- GLYNN, M. 1989. Water threat prompts California scientists to urge ban on use of aldicarb. The Packer, Los Angeles (USA). Sept. 30. P. 3A.
- GOELDI, E.A. 1887. Relatoria sobre a molestia do cafeeiro no provincia do Rio Janeiro. Apparently an advance separate of: Arch. Mus. Nac. Rio Janeiro 8:7-21. Citado por Taylor, L.A. Sasser, N.J. 1983. Biología, identificación y control de los nematodos de nódulo de la raíz. Proyecto Internacional de *Meloidogyne*. Departamento de Fitopatología de la Universidad del Estado de Carolina del Norte. Pág. 1.

- GOMEZ, T.J., PUERTA, D.F. GOMEZ, A.R. 1981. Nematodos fitoparásitos asociados a las siembras de arroz en la terraza de Ibagué. Arroz, Bogotá, Colombia. V. 30, No. 313. pp. 17-24.
- GOES, P.L.E.M. VAN, ROOY DE F. 1988. Investigación preliminar sobre el control biológico del nematodo barrenador *Radopholus similis* en banano en Costa Rica. Convenio ASBANA y la Universidad Agrícola de Wageningen, Holanda.
- GOWEN, R.S. and AHMED, R. 1990. *Pasteuria penetrans* for control of pathogenic nematodes. Aspects of Applied Biology. Department of Agriculture. University of Reading, Early Gate. pp. 25-32.
- GOWEN, S.R. and CHANNER, A.G. 1988. The production of *Pasteuria penetrans* for control of root-knot nematodes. Brighton Crop Protection Conference, Pests and Diseases. Pp. 1215-1220.
- HADISOEGANDA, W.W.; SASSER, J.N. 1982. Resistance of tomato, bean, southern pea and garden pea cultivars to root-knot nematodes based on host suitability. Plant disease 66(2):145-150.
- HELENITA, A., LEHMAN, P.S. 1978. Nota sobre a ocorrência nematoides de Genero *Meloidogyne* em algumas ervas daninhas nos estados do Paraná do Rio Grande do Sul. III Reuniao de Nematologia. Sociedade Brasileira de Nematologia Public. No. 3. P. 29.
- JATALA, P. 1982. Interrelaciones de los nematodos con otros organismos. Primer curso internacional de nematodos en papa. Centro Internacional de la Papa, Lima, Perú. Pág. 2.
- JENKINS, W.R. 1964. A rapid centrifugal flotation. Technique for separating nematodes from soil. Plant Disease Reporter 48(9):692.

- JOBERT, C. 1878. Sur un maladie du cafeier observu au Bresil. Comp. rend. hebdom. Seanc. Acad. Sci. Paris 87:941-943.  
Citado por Taylor, L.A. Sasser, N.J. 1983. Biología, identificación y control de los nematodos de nódulo de la raíz. Proyecto Internacional de *Meloidogyne*. Departamento de Fitopatología de la Universidad del Estado de Carolina del Norte. Pág. 1.
- LOPEZ, R., SALAZAR, L. 1989. *Meloidogyne arabicida* sp.n. (Nemata: Heteroderidae) nativo de Costa Rica: un nuevo y severo patógeno de café. Turrialba (Costa Rica) 39(3) 279-427.
- MANKAU, R. 1980. Biological control of *Meloidogyne* populations by *Bacillus penetrans* in West Africa. Journal of Nematology 12:230.
- \_\_\_\_\_. 1975. *Bacillus penetrans* n. comb. causing a virulent disease of plant-parasitic nematodes. Journal of Invertebrate Pathology 26:333-339.
- MARBAN, M., M. 1985. Quimioterapia en nematodos. In Marban, N.M., Thomson, I.J. Fitonematología Avanzada I.
- MARBAN, N., TORRES, M.O. CALDERON, M. 1989a. Etiología de la corchosis del cafeto en Costa Rica. XII Simposio sobre Caficultura Moderna. IICA/PROMECAFE, San Pedro Sula, Honduras. 425 p.
- MARBAN, M.N., KICKLON, M.B., ZUCKERMAN, B.M. 1989b. Evaluation of control of *Meloidogyne incognita* and *Nacobbos aberrans* on tomato by two leguminous plants. Revue Nematologie 12(4):409-412.
- MARBAN, M. N. and B. VIGLIERCHIO. 1980. Behavioral effects of carbofuran and phenamiphos on *Pratylenchus vulnus*. I. Motility and dispersion. J. Nematol. 112:102-114.
- MC SORLEY, R., DICKSON, D.W. 1989. Incremento en los niveles de las poblaciones de nematodos en cultivos de cobertura como centeno y vizia. Nematrópica 19(1), Junio. Florida, USA.

- MORGAN-JONES, G. and R. RODRIGUEZ-KABANA. 1985. Phytonematode pathology: Fungal modes of action. A prospective. *Nematropica* 15:107-114.
- RAJ, M.A.J. and MANI, A. 1988. Biocontrol of *Meloidogyne javanica* with the bacterial spore parasite *Pasteuria penetrans*. *International Nematology Network Newsletter* 5: 3-4.
- RAMIREZ, A.L. y RAMIREZ, C.M. 1980. Esterilidad masculina causada por la exposición laboral al nematocida 1,2-Dibromo-3 cloropropano. *Act. Met. Cost.* Vol. 23-No. 3, p. 219-222.
- RHODE, R.A. and M.A. McCLURE. 1975. Autoradiography of developing syncytia in cotton roots infected with *Meloidogyne incognita*. *Jour. Nematol.* 7:64-69. Citado por Taylor, L.A. Sasser, N.J. 1983. *Biología, identificación y control de los nematodos de nódulo de la raíz. Proyecto Internacional de Meloidogyne.* Departamento de Fitopatología de la Universidad del Estado de Carolina del Norte. Pág. 17.
- RODRIGUEZ, K.R. 1991. Control biológico de nematodos parásitos de plantas. *Nematropica (U.S.A.)* 21(1):111-122.
- ROJAS, T. 1989. Reconocimiento de nematodos en pimienta (*Piper nigrum*) en la Zona Atlántica y Zona Norte de Costa Rica. Informe Anual a la Dirección de Investigaciones Agrícolas. Ministerio de Agricultura y Ganadería, San José, Costa Rica.
- \_\_\_\_\_. 1989. Evaluación de nematocidas para el combate de *Meloidogyne incognita* en el cultivo de pimienta (*Piper nigrum*) en el Cantón de Pococí en la Zona Atlántica de Costa Rica. Informe Anual a la Dirección de Investigaciones Agrícolas. Ministerio de Agricultura y Ganadería. San José, Costa Rica.
- \_\_\_\_\_. 1990a. Reconocimiento de nematodos fitoparásitos asociados al cultivo de maíz en la Zona Atlántica de Costa Rica. Informe Anual a la Dirección de Investigaciones Agrícolas. Ministerio de Agricultura y Ganadería. San José, Costa Rica.

- \_\_\_\_\_. 1990b. Combate de nematodos por medio de rotación de cultivos, en Guápiles. Informe Anual a la Dirección de Investigaciones Agrícolas. Ministerio de Agricultura y Ganadería. San José, Costa Rica.
- SAYRE, R.M. 1971. Biotic influences in soil environment. *In*: Plant Parasitic Nematodes, eds. B.M. Zuckerman, W.F. Mai and R.A. Rohde. Academic Press, New York and London Vol. I. pp. 235-256.
- SAYRE, R.M. and STARR, M.P. 1985. *Pasteuria penetrans* (ex Thorne 1940) nom. rev., comb. n., sp. n., a micelial and endospore-forming bacterium parasitic in plant parasitic nematodes. Proceedings of the Helminthological Society of Washington, 52:149-65. Citado por Stirling, R.G. 1991. Control of plant parasitic nematodes. C.A.B. Internacional. pág. 75.
- SAYRE, R.M. y STARR, M.P. 1988. Bacterial diseases and antagonisms of nematodes. *In*: Poinar, G.O. and Jansson, H.B. (eds.) Diseases of Nematodes. Vol. 1. CRC Press, Boca Ratón, Pp. 69-101.
- STIRLING, R.G. 1991. Biological control of plant parasitic nematodes. C.A.B. Internacional. 281 p.
- \_\_\_\_\_. 1984. Biological control of *Meloidogyne javanica* with *Bacillus penetrans*. Phytopathology 74: 55-60.
- STIRLING, R.G., SHARMA, R.D. and PERRY, J. 1990. Attachment of *Pasteuria penetrans* spores to the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* in soil and its effect on infectivity. Nematologica 36:246-252.
- TAYLOR, L.A., SASSER, N.J. 1983. Biología, identificación y control de los nematodos de nódulo de la raíz. Proyecto Internacional de *Meloidogyne*. Departamento de Fitopatología de la Universidad del Estado de Carolina del Norte.
- THORNER, G. 1940. *Dubosquia penetrans* n.sp. (Sporozoa: Microsporidia, Bosematidae) a parasite of the nematode *Pratylenchus pratensis* (de Man) Filipjev. Proceedings of the Helminthological Society of Washington 7:51-3. Citado por Stirling, R.G. 1991. Control of plant parasitic nematodes. C.A.B. Internacional pág. 75.

- VILARDI, T.R.C., GONZAGA, L. 1980. Influencia de mucuna prata (*Stizolobium aterrimum*, Piper, Tracy) no ciclo de *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White 1919) Chitwood, 1949. IV Reuniao de Nematologia Sociedades Brasileira de Nematologia, Public. No. 4. Pag. 213.
- WEBSTER, J.M. 1972. Nematodes and biological control. Pages 469-496. *In*: Economic Nematology, ed. J.M. Webster. Academic Press Inc. London and New York.
- ZAVALETA, M.E. 1985. Las bacterias como agentes de control biológico de nematodos fitopatógenos. *In* Marbán, N.M., Thomason, I.J. Fitonematología Avanzada I. Departamento Editorial del Colegio de Postgraduados, Chapingo, México. P. 195-214.
- ZUCKERMAN, B.M., MAI, W.F., HARRISON, M.B. 1987. Fitonematología, Manual de Laboratorio. Trad. al español por Marbán, M.N. Centro de Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Montecillos, México. Publicado por CATIE, Turrialba, Costa Rica.

A N E X O S

## Anexo 1. Preparación del Ethoprop

Anexo 2. Escala para estimar el índice de agallamiento en el sistema radical en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) provocado por *Meloidogyne arabicida*.

---

Índice de agallamiento	Porcentaje de agallamiento radical del total del sistema
0	0
1	10-19
2	20-59
3	60-79
4	80-90
5	100

---

Tomado de: Barker (1987) citado por Zuckerman, (1987).

Anexo 3. Procesamiento de muestras para infiltración en parafina (para plos plus)

---

1. Deshidratación con alcohol butílico terciario

Alcohol butílico terciario	50%	2 horas
ABT	70%	Toda la noche
ABT	80%	2 horas
ABT	85%	1 hora
ABT	90%	1 hora
ABT	95%	1 hora
ABT	100%	Toda la noche
ABT	100%	2 a 4 horas
ABT	100%	2 a 4 horas
ABT + parafina 1:1		1 hora
parafina pura sucia		3 horas
parafina pura		2 horas
parafina		2 horas

2. Formación de los bloques en parafina para su respectivo corte en secciones de 8  $\mu\text{m}$  de grosor, en un micrótopo de rotación.

3. Tinción: Se utilizará la técnica de Safranina Fast Green, aunque se probarán otras coloraciones (cuádruple coloración).

Xileno A	10 minutos
Xileno B	10 minutos
Xileno-alcohol	5 minutos
Alcohol absoluto	3 minutos
Alcohol 95%	3 minutos
Alcohol 75%	3 minutos
Alcohol 70%	3 minutos
Safranina	30 minutos
Agua	5 segundos
Alcohol 70%	3 minutos
Alcohol 90%	3 minutos
Alcohol 95%	3 minutos

## Cont. Anexo 3

Alcohol 100%	3 minutos
Fast-Green	15 segundos
Alcohol 100%	3 minutos
Xileno-alcohol	5 minutos
Xileno	5 minutos
Xileno	5 minutos

---

Fuente: CIRAD, 1989

Anexo 4. Procesamiento de muestras para infiltración en resina.

---

1. Fijación de las muestras en FAA
  2. Deshidratación con alcohol
    - 50% 1 hora
    - 70% 1 hora
    - 80% 1 hora
    - 90% 1 hora
    - 95% 1 hora
    - 100% 1 hora
    - 100% 1 hora
  3. Infiltración en historesina
  4. Cortes en un micrótomo a 2-3  $\mu\text{m}$  de grosor.
  5. Tinción con toluidina azul
- 

Fuente: CIRAD (1989)