

**PROGRAMA DE EDUCACIÓN PARA EL DESARROLLO Y LA CONSERVACIÓN  
ESCUELA DE POSGRADO**

**ESTUDIO DE POBLACIONES DE BACTERIAS ENDOFITICAS DE LA  
RIZOSFERA DEL BANANO PARA EL BIOCONTROL DEL NEMATODO  
BARRENADOR *Radopholus similis***

**Tesis sometida a la consideración de la Escuela de Posgraduados, Programa de  
Educación para el Desarrollo y la Conservación del Centro Agronómico Tropical de  
Investigación y Enseñanza, como requisito parcial para optar al grado de :**

**Magister Scientiae**

**Por**

**Carmen Núñez Pérez**

**Turrialba, Costa Rica  
2006**

Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma por el Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación de la Escuela de Posgrado del CATIE y aprobada por el Comité Consejero del Estudiante como requisito parcial para optar por el grado de :

**MAGÍSTER SCIENTIAE**

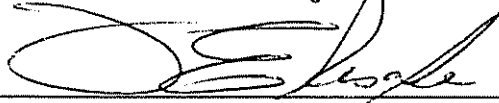
**FIRMANTES**



Luis E. Pocasangre, Ph. D.  
**Consejero Principal**



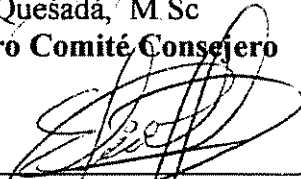
Alba Stella Riveros, Ph.D  
**Miembro Comité Consejero**



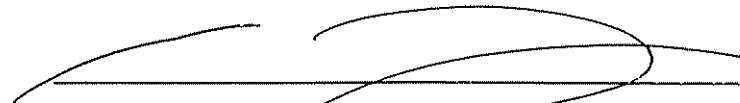
Franklin E. Rosales, Ph.D.  
**Miembro Comité Consejero**



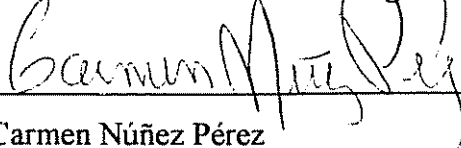
Miguel Quesada, M.Sc  
**Miembro Comité Consejero**



Eduardo Delgado, Ph.D.  
**Miembro Comité Consejero**



Glenn Galloway, Ph. D.  
**Director Programa de Educación y  
Decano de la Escuela de Posgrado**



Carmen Núñez Pérez  
**Candidata**

## **DEDICATORIA**

**A DIOS** mi señor

**A mis PADRES** con mucho amor por todo su apoyo

**A mis HIJOS** (Jorge Andrés, Sofía, Cristian, y mi chiquito Alex André)

**Que son el Objetivo de mi Vida.**

## AGRADECIMIENTOS

La autora quiere expresar su más sincero agradecimiento al Dr. Luis Pocasangre, por su valioso apoyo y ayuda brindada en los dos años de formación profesional y personal, sin la cual no habría alcanzado las metas hoy cumplidas.

A INIBAP y todo su equipo de trabajo, Dr. Franklin Rosales, Dra Alba Estela Riveros, Dr Eduardo Delgado, Sra. Lissett Vega, por su disposición de ayuda.

A la compañía Del Monte, y el personal de trabajo de Nematología por su colaboración en el trabajo de campo, y en todo momento de la trayectoria de la investigación, mis más sinceros agradecimientos a Msc.Miguel Quesada, Ing. Harold Molina y auxiliares Juan Carlos, Roger, Miguel, Alexis, Oscar, Fernando (Filacho).

A Gustavo López Pérez (primo) por su gran apoyo brindado en todos los análisis de datos y su paciencia para conmigo.

Al personal de laboratorio de Fitopatología y Nematología del CATIE, a Nancy Chávez, a Manrique González, por su colaboración durante el proceso de investigación.

Y a todos mis compañeros de Agricultura Ecológica, por su gran apoyo, en estos dos años, gracias a todos.

## **BIOGRAFÍA**

La autora nació en San José, Costa Rica, vive actualmente en Turrialba. Se graduó en la Universidad de Costa Rica en la Facultad de Agronomía, como Ingeniera Agrónoma con énfasis en producción. Ha laborado en el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) en programas de Manejo Integrado de Plagas (MIP), como consultora en el Instituto Interamericano de Ciencias para la Agricultura (IICA) en el Proyecto de PROMECAFE, con el Programa de mejoramiento genético del café, en la evaluación de variedades resistentes a la enfermedades. Posteriormente, en el Proyecto de detección de enfermedades en cultivos anuales, financiado por el CIRAD.

Actualmente, trabaja en el Laboratorio de Fitopatología como apoyo en la investigación de control biológico en el Proyecto Calidad de Suelos, ejecutado por INIBAP. Paralelamente, ha efectuado estudios de posgrado en la Escuela de Posgraduados, Programa de educación para el desarrollo y la conservación del CATIE.

## CONTENIDO

DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	iv
BIOGRAFÍA	v
CONTENIDO	vi
RESUMEN	viii
SUMMARY	ix
LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo general	3
2.2 Objetivos específicos	3
3. HIPOTESIS	3
4. REVISIÓN DE LITERATURA	4
4.1 El cultivo del banano	4
4.2 Némátodos fitopatógenos en banano	4
4.3 Patogenicidad de <i>Radopholus similis</i>	5
4.4 Métodos de control	5
4.4.1 Control biológico	6
4.5 Características de las bacterias	8
4.6. Bacterias endofíticas	8
4.7. Interacción bacterias-bacterias	9
4.8. Interacción bacteria-hongo	10
4.9. Interacción bacteria-nemátodo	10
4.10. Bacterias promotoras de crecimiento	11
4.11. Características de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	13
4.12. Características de <i>Bacillus thuringiensis</i> y sus toxinas insecticidas	13
5. MATERIALES Y METODOS	14
5.1. Localización de estudio	14
5.2. Selección de sitios de muestreo	15
5.3. Aislamiento y obtención de bacterias endofíticas	15
5.3.1. Preparación de medios de cultivo para bacterias	16
5.4. Pruebas bioquímicas para identificación de bacterias	16
5.4.1. Prueba KOH	16
5.4.2. Prueba de <i>Bacillus</i>	17
5.4.3. Medios específicos B-King	17

5.5. Caracterización morfológica	18
5.6. Aislamiento y purificación de bacterias	18
5.7. Selección de bacterias endofíticas como promotoras de crecimiento y potencial antagonista contra <i>R. similis</i>	18
5.7.1. Reproducción de bacterias coleccionadas	18
5.8. Cultivo aséptico de <i>R. similis</i>	18
5.8.1. Preparación de discos de zanahoria para la reproducción de <i>R. similis</i>	19
5.8.2. Inoculación de los discos de zanahoria con <i>R. similis</i>	19
5.9. Preparación de sustrato	19
5.10. Material vegetal	19
5.11. Selección de bacterias endofíticas (penetración y colonización)	20
5.11.1. Inoculación de vitroplantas con bacterias endofíticas	20
5.11.2. Pruebas de colonización	20
5.11.3. Pruebas de penetración	21
5.11.4. Inoculación del material vegetativo con <i>R. similis</i>	21
5.11.5. Extracción de nemátodos	22
5.12. Experimentos a evaluar	22
5.13. Biocontrol de <i>R. similis</i>	22
5.13.1. Descripción de los tratamientos	23
5.13.2. Variables respuesta	23
5.14. Promoción de crecimiento	23
5.14.1. Variables de respuesta	24
5.15. Diseño experimental	24
5.16. Análisis estadístico	25
6. RESULTADOS	26
6.1. Diversidad de bacterias endofíticas	26
6.2. Caracterización morfológica	27
6.3. Purificación de aislamientos de bacterias endofíticas	29
6.4. Selección de bacterias endofíticas con actividad antagonista contra <i>R. similis</i>	31
6.5. Efecto de los aislados endofíticos en la actividad de biocontrol contra <i>R. similis</i>	35
6.6. Promoción de crecimiento	38
7. DISCUSIÓN	42
7.1. Diversidad de bacterias endofíticas	42
7.2. Bioensayos para medir el efecto de biocontrol	45
7.3. Bioensayos para medir el efecto sobre la promoción de crecimiento	47
8. CONCLUSIONES	48
9. RECOMENDACIONES	49
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
11. ANEXOS	59

NUÑEZ PEREZ, C. ESTUDIO DE POBLACIONES DE BACTERIAS ENDOFÍTICAS DE LA RIZOSFERA DEL BANANO PARA EL BIOCONTROL DEL NEMATODO BARRENADOR *Radopholus similis*

RESUMEN

**Palabras claves:** bacterias endofíticas, *Pseudomonas*, *Bacillus*, actividad de biocontrol, colonización, *Radopholus similis*, promoción de crecimiento, bananos.

Un total de 242 aislamientos de bacterias endofíticas fueron recobrados de sitios de alta y baja producción de 12 fincas comerciales de banano localizadas en la zona atlántica de Costa Rica. Los géneros de bacterias endofíticas más frecuentemente encontrados fueron *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. Sesenta y cuatro ( 64) aislamientos de bacterias endofíticas de estos géneros fueron seleccionados para evaluar su habilidad de colonización y penetración de *Radopholus similis* en el sistema radical. En general la mayoría de los aislamientos endofíticos colonizaron exitosamente los órganos de la planta alcanzando promedios de 97% para *Pseudomonas* y 95% para *Bacillus*. Los porcentajes de colonización fueron mayores en las raíces y el cormo que en el seudotallo y hojas. De los 64 aislamientos de bacterias evaluados, 24 aislamientos presentaron porcentajes de penetración inferiores al 4%, siendo estadísticamente diferentes del control con nematodos. Entre las bacterias prospectos sobresalieron para el genero *Bacillus*, los aislamientos B-56, B-62, B-26, B-37 B-61 y para grupo de *Pseudomonas* los aislamientos P-46, P-52, P-64, P-58 y P-8. En base a los resultados de colonización y penetración 30 aislamientos fueron evaluados para conocer su actividad de biocontrol sobre *Radopholus similis* y su efecto sobre parámetros de crecimiento, encontrándose que los aislamientos prospectos del grupo *Pseudomonas* P-52 y P-58 presentaron porcentajes de biocontrol en el cultivar Williams de 96% y 94%, respectivamente y en el cultivar Gran Enano de 70% y 83%. En relación al grupo *Bacillus* las dos mejores bacterias fueron los aislamientos B-21 y B-50 con una actividad de biocontrol en el cultivar Williams de 87% y 84% respectivamente y en el cultivar Gran Enano de 72% y 68%. En relación a su efecto sobre la promoción de crecimiento no se encontraron diferencias significativas en peso radical, peso fresco, longitud radical, diámetro radical y volumen radical en comparación con el testigo sin inoculación con bacterias.



**NUÑEZ PEREZ, C. STUDY OF BANANA RHIZOSPHERE ENDOPHYTIC BACTERIA POPULATIONS TO BIOCONTROL *Radopholus similis* BORER NEMATODE**

**SUMMARY**

**Keywords:** endophytic bacteria, *Pseudomonas*, *Bacillus* biocontrol activity, colonization, *Radopholus similis*, plant growth promotion, bananas.

A total of 242 endophytic bacteria isolates were recovered from high and low production sites in 12 commercial banana farms located in the Atlantic area of Costa Rica. The most frequent bacteria genus found were *Bacillus* spp. and *Pseudomonas* spp. A total of 64 endophytic bacteria isolates from these genus were selected to evaluate their abilities to colonize and penetrate *Radopholus similis* at the radical system. In general, most endophytic isolates successfully colonized plant organs obtaining averages of 97% for *Pseudomonas* and 95% for *Bacillus*. Colonization percentages were higher in the roots and the corm than in the pseudostem and leaves. From the 64 bacteria isolates evaluated, 24 showed penetration percentages below 4% which is statistically different from the control. Among prospects bacteria for the *Bacillus* genus stand out B-56, B-62, B-26, B-37 B-61 and for the *Pseudomonas* isolates P-46, P-52, P-64, P-58 y P-8. Based on the colonization and penetration results, 30 isolates were evaluated to study their activity and biocontrol on *Radopholus similis* and their effect on plant growth promotion. It was found that prospects *Pseudomonas* isolates P-52 and P-58 showed 96% and 94% biocontrol, respectively, for the 'Williams's cultivar, and 70% and 83%, respectively, for the 'Grand Naine' cultivar. In relation to the prospect *Bacillus* group, the two best bacteria were B-21 and B-50 isolates with 87% and 84%, respectively, on Williams's cultivar and 72% and 68%, respectively on Grand Naine cultivar. In relation to their effect on plant growth promotion, no significant differences were found regarding root weight, fresh weight, root length, root diameter and root volume compared to the non inoculated check.

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Pruebas de Chi cuadrado para medir la asociación entre sitios de producción y presencia de bacterias.	27
Cuadro 2. Prueba de Chi-cuadrado para comparar las formas de las colonias de las bacterias predominantes encontradas en los sitios de alta y baja producción de las doce fincas estudiadas.	27
Cuadro 3. Prueba de Chi-cuadrado para comparar los colores de las colonias de las bacterias predominantes encontradas en los sitios de alta y baja producción de las doce fincas estudiadas.	28
Cuadro 4. Resultado total de bacterias endofíticas aisladas y purificadas de las 12 fincas.	30
Cuadro 5: Porcentaje de penetración de <i>Radopholus similis</i> en plantas de Gran Enano 7 días después de la inoculación.	31
Cuadro 6: Porcentaje de colonización de bacterias endofíticas en los órganos de plantas del cultivar Gran Enano.	33
Cuadro 7. Selección de las mejores 30 bacterias endofíticas basado en la reducción de la penetración y habilidad de colonización de las plantas.	34
Cuadro 8: Efecto de 30 bacterias endofíticas sobre el control de <i>Radopholus similis</i> después de 6 semanas de la inoculación de nematodos	36
Cuadro 9. Efecto de 30 bacterias endofíticas sobre el control de <i>Radopholus similis</i> en el cultivar Gran Enano, después de seis semanas de la inoculación con nematodos.	37
Cuadro 10. Efecto de las mejores 10 bacterias sobre el control de <i>Radopholus similis</i> , en las variedades Gran Enano y Williams.	38
Cuadro 11. Efecto de las 30 bacterias endofíticas sobre la promoción en la variedad Williams, después de ocho semanas de crecimiento.	40
Cuadro 12. Efecto de 30 bacterias endofíticas sobre la promoción de crecimiento de plantas del cultivar Gran Enano, después de ocho semanas de crecimiento.	41

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Metodología utilizada para extraer las bacterias endofíticas de los tejidos internos de las raíces.	16
Figura 2.	Prueba de KOH para determinar bacterias Gram- y Gram +.	17
Figura 3.	<i>Pseudomonas</i> spp vista en una cámara de luz ultravioleta de 365nm. comparada con una <i>Bacillus</i> spp.	17
Figura 4.	Total de bacterias endofíticas, aisladas por finca convencionales Comerciales.	26
Figura 5.	Formas y colores encontrados, para la descripción de las bacterias.	29
Figura 6.	Formas de bacterias endofíticas que predominaron en el género <i>Pseudomonas</i> .	29

## 1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de banano (*Musa spp.*) es muy importante en casi todos los países ubicados en zonas tropicales, y constituye una de las principales fuentes de ingreso en las economías de muchos países (Jones 2000). Está completamente establecido que los fitonematodos son los patógenos de mayor importancia del sistema radical en banano y en plátano (Gowen y Quénéhervé 1990, Bridge 1993, Jeger, 1996). Los endoparásitos migratorios *Radopholus similis* y *Pratylenchus coffeae*, el ectoparásito *Helicotylenchus multicinctus* ó *H. Dyhisteria* y el endoparásito sedentario *Meloidogyne incógnita* ó *M. javanica* son los más importantes, siendo *Radopholus similis* el más abundante en la mayoría de los países de América Central, África Occidental y Australia (Jones 2000). Pérdidas económicas entre 10 al 50% han sido documentadas en plantaciones comerciales de banano en varios países productores en el ámbito internacional. (Tarté *et al.* 1981, Pinochet 1986, Davide 1996).

Actualmente, el manejo convencional de fitonematodos, no sido eficiente y en algunos casos el problema del deterioro del sistema radical se ha incrementado, resultando en plantaciones altamente infestadas, las cuales difícilmente pueden recuperarse a un nivel productivo económicamente rentable. Por otra parte, este método de control reduce las poblaciones de antagonistas naturales de fitonematodos presentes en el suelo y asociados a la rizosfera (Pocasangre 004), a la vez es poco eficiente, muy costoso para los pequeños y medianos agricultores, contaminan el ambiente, las aguas, ríos eliminando agentes biológicos (Pocasangre 2002). Es por eso que los nematicidas han sido prohibidos en muchos países y serán cancelados del mercado en un futuro cercano (Oka *et al.* 2000).

Numerosos organismos del suelo se han encontrado atacando nemátodos, entre ellos los hongos y bacterias son los más conocidos, aunque también protozoos, insectos, ácaros, turbelarios, virus y nemátodos depredadores ejercen regulación bajo diferentes condiciones del ecosistema (Kerry y Muller 1980, Rodríguez *et al.* 1985).

Recientes estudios indican que las comunidades microbiológicas específicas de la rizosfera, Rhizosphere Specific Microbial Communities (RSMC), pueden afectar el desarrollo de las enfermedades y pestes tales como los nematodos. Asimismo RSMC puede influir en el crecimiento positivo o negativo de las plantas, debido al tipo de interacción con los

patógenos. Los RMSC pueden mejorar la sanidad de la planta, y provocar una influencia en raíces resistentes y/o tolerantes a patógenos o plagas (Vilich y Sikora 1998).

Jacobs *et al.* (1985) reportan que altas poblaciones de bacterias fueron encontradas en la zona de emergencia de las raíces secundarias (SREZ), en tejidos no dañados. Por otro lado, bacterias no patogénicas puede presentar la relación simbiótica en tejido sano sin producir obviamente efectos detrimentales. En la actualidad se sabe muy poco de las poblaciones de bacterias endofíticas asociadas a la rizosfera del banano por lo que, su utilización para el mejoramiento biológico de plantas de banano podría ser una nueva alternativa para el biocontrol de nematodos. Consecuentemente, la presente investigación pretende estudiar las poblaciones naturales de bacterias endofíticas presentes en la rizosfera del banano y su posible rol supresivo sobre los fitonematodos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo general

Caracterizar la diversidad de bacterias endofíticas presentes en la rizosfera de banano para determinar su potencial antagonista sobre el nematodo barrenador (*Radopholus similis*).

### 2.2. Objetivos específicos

- Determinar la diversidad de bacterias endofíticas presentes en la rizosfera del banano en plantaciones comerciales de Costa Rica.
- Estudiar el potencial antagonista de los aislados de bacterias endofíticas sobre el nematodo barrenador *R. similis*.
- Realizar un *screening* de bacterias endofíticas para evaluar su efecto sobre la promoción de crecimiento en plantas de banano.

## 3. HIPÓTESIS

- La diversidad de bacterias endofíticas es diferente entre plantaciones comerciales de banano con diferentes niveles de productividad.
- Bacterias endofíticas tienen un efecto antagonista contra el nematodo barrenador *Radopholus similis*.
- Bacterias endofíticas promueven el crecimiento radical y foliar de plantas de banano.

## 4. REVISIÓN DE LITERATURA

### 4.1. El cultivo del banano

Las exportaciones de banano ocupan un lugar destacado dentro del conjunto de regiones generadoras de divisas de los países de América Latina, El Caribe, Asia y África, constituyendo el producto básico de la alimentación de estos pueblos. La intensificación y tecnificación de estos cultivos conlleva a que su protección adquiera cada día mayor importancia. Las condiciones ecológicas de las regiones tropicales y subtropicales son ideales para el cultivo del banano, pero a su vez para el desarrollo de enfermedades y plagas (Rosero 1987). La producción de banano en 2001 se estimó en cerca de 30 millones de toneladas de acuerdo con informes de la FAO (2001). Las mayores regiones productoras de banano a nivel mundial son Asia (42%) y Latinoamérica (44%). Además, el 86% de las exportaciones a nivel mundial corresponden al área de Latinoamérica y el Caribe, donde se encuentran cuatro de los cinco países de mayor exportación en el mundo.

El combate de las plagas y enfermedades en el banano representan uno de los costos de producción más altos en el cultivo. El cultivo del banano es atacado por diversos patógenos, que incluyen hongos, bacterias y virus. Entre las principales plagas y enfermedades que han tenido impactos negativos en la historia del banano están: Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* var. *diiformis*), Sigatoka Amarilla (*M. musicola*), Moko (*Ralstonia solanacearum*) y Mal de Panamá (*Fusarium oxysporum* var. *cubense*), Nematodos (*Radopholus similis*, *Pratylenchus* spp. *Meloidogyne incógnita* y *Helicotylenchus* spp y Picudo *Cosmopolites sordidus* (Stover y Simmonds 1987).

### 4.2. Nematodos fitopatógenos en banano

En Costa Rica, uno de los principales problemas en la producción de banano y plátano son los nematodos parásitos de las plantas, principalmente *R. similis* (Araya *et al.* 1995). En banano y plátano un total de 19 géneros de nematodos han sido asociados con daños a su sistema radical y al cormo, dentro de los cuales los cinco más importantes son: *Radopholus similis*, *Pratylenchus coffea*, *Helicotylenchus multicinctus*, *Meloidogyne* spp y *Rotylenchus reniformis*. Dentro de éstos, *Radopholus similis* es el de mayor importancia

económica en la producción de banano. Los rendimientos de las plantaciones de *Musa* por lo general comienzan a declinar a partir de la segunda generación del cultivo por la destrucción del sistema radical causado por éste nematodo (Rodríguez *et al.* 1985). Se ha reportado que *R. Similis* puede llegar a reducir la producción de sistemas intensivos hasta un 30-50% del rendimiento (Jones 2000). Además, altas poblaciones de *R. similis* pueden resultar en desraizamiento de la planta y volcamiento, especialmente durante vientos y lluvias fuertes, causando pérdidas económicas (Gowen y Quénéhervé 1990; Fogain y Gowen 1997; Pocasangre *et al.* 2000; Pocasangre 2002). El nematodo barrenador causa lesiones negro-rojizas en la región externa de la raíz, penetrando a través del cortex, hasta conducir a una atrofia radical, y en niveles altos de incidencia pueden causar lesiones múltiples del rizoma (cormo) y necrosis hasta causar la caída de la planta (Gowen y Quénéhervé 1990).

#### **4.3. Patogenicidad de *Radopholus similis***

*Radopholus similis* vive preferiblemente en temperaturas que fluctúan entre 24 y 32° C. Su reproducción óptima se lleva a cabo a 30° C. No se reproduce si la temperatura es menor de 16°C ó sobrepasa los 33°C. El nematodo barrenador es endoparásito migratorio que completa su ciclo de vida entre 20 y 25 días dentro de los tejidos de la raíz y del rizoma. Las hembras juveniles y adultas tienen formas móviles que pueden dejar la raíz en caso de condiciones adversas (Sarah *et al.* 1996). Los estadios larvales en el suelo pueden fácilmente invadir raíces sanas. La penetración de los nematodos ocurre cerca del ápice radical, pero *R. similis* puede invadir cualquier porción de la raíz, donde ingresan hongos y bacterias que aceleran la pudrición del sistema radicular por lo que la absorción de agua y nutrientes del suelo es distorsionado debilitando a las plantas afectando negativamente su producción y rendimiento.

#### **4.4. Métodos de control**

En plantaciones comerciales de banano el método tradicional de control de nematodos es el uso repetido de nematicidas no-fumigantes (Cabrera *et al.* 2005). Los nematicidas, utilizados hasta ahora, han sido generalmente órgano fosforados o carbamatos, los cuales



son aplicados como gránulos sobre la superficie del suelo alrededor de la planta de forma calendarizada que indica el número de veces que deben ser utilizados en el cultivo sin importar si el banano se encuentra o no afectado por la plaga del momento. Las aplicaciones indiscriminadas de nematicidas han causado un gran número de intoxicaciones o enfermedades crónicas entre los trabajadores bananeros, conllevando un efecto biocida en los suelos que son tratados con éstos (Sarah *et al* 1996).

#### 4.4.1 Control biológico

Se han estudiado y desarrollado una serie de opciones que involucran el uso de diferentes métodos para el control de enfermedades, que incluye sanidad de cultivos, rotación, selección de plantas libres de enfermedades y más recientemente, el empleo de microorganismos benéficos del suelo, que antagonizan a los nematodos (Sikora 1992). Recientemente, se han realizado estudios en la India. Ganesan y Gnanamanickam (1987); Savithiry y Gnanamanickam (1987) Sivamani y Gnanamanickam (1988) y Vasantha Devi *et al* (1989) han documentado el potencial antagonista de microorganismos colonizadores de las raíces mediante la inhibición o desplazamiento de patógenos de la rizosfera (Anuratha y Gnanamanickam 1990).

Una de las observaciones más conocidas sobre control biológico es la de los suelos supresivos en los cuales el desarrollo y la actividad de los patógenos son mínimos, si se compara con la de los suelos conductivos, donde el microorganismo plaga tiene todas las ventajas para atacar la planta (Chet y Baker 1980). Esta supresividad se fundamenta en la existencia de un amplio espectro de microorganismos que forman parte de un sistema complejo de interacciones que conforman la rizosfera donde la competencia por las fuentes alimenticias, nichos y dinámicas entre predador-presa ayudan a limitar la población de microorganismos con potencial de plaga. (Baker y Pautiz 1996, Altieri 1992).

En la actualidad, el control biológico de nematodos se abre camino con el uso de hongos, reducciones hasta de un 90% de la población final de *R. similis* en el sistema radical de plantas protegidas con hongos endofíticos han sido registrados en varios experimentos repetidos en el tiempo (Pocasangre 2000, Pocasangre *et al* 2000), hongos micorríticos,

rizobacterias promotoras de crecimiento y bacterias endofíticas, demostrándose en varias ocasiones que la colonización de las plantas con estos microorganismos inducen a una resistencia efectiva contra hongos, bacterias, virus y nematodos patógenos (Tzum y Kloepper 1995, Jaizme 1998, Sikora 2003).

Un caso exitoso para el control biológico de fitonematodos es descrito por (Fernández y Vega 2001), quienes reportan que al inocular, en forma temprana, plantas de banano con cepas del género *Glomus* permitieron atenuar el daño causado por *R. similis* y *M. Incógnita* hasta en un 85%. Los mismos autores reportan que en Cuba, la utilización de hongos como *Paecylomyces lilacinus* y bacterias como *Bacillus thuringensis* var. *kurstaki* y *Corynebacterium paurometabolum*, han tenido gran éxito en el control de *R. similis*, tanto en ensayos llevados a cabo en condiciones controladas de campo.

La inducción de resistencia en plantas de banano Gran Enano, mediante la inoculación con cepas de micorrizas, ha sido demostrada en varias ocasiones. Jaizme (1998), documentó que una inoculación micorrítica temprana en el cultivar Gran Enano incrementó la tolerancia a *R. similis*. Esta protección se explica muy probablemente por el trabajo extra de bacterias promotoras de crecimiento, liberadas durante la interacción micorriza-planta, que estimulan de forma directa el crecimiento vegetativo y activan los mecanismos de defensa hacia el ataque de fitonematodos. Por otro lado, se ha demostrado que en las raíces de las plantas se establecen relaciones simbióticas con comunidades de microorganismos específicos, los cuáles son atraídos mediante exudados que son producidos por la planta y que son emitidos mediante la endorriza (Sikora 2003).

Las interacciones que pueden tener lugar en la rizosfera son desarrolladas como controladores biológicos. Las interacciones de bacterias usadas como agentes biocontroladores, de bacterias contra hongos de plantas son considerados. Sin embargo, los posibles modo de acción desarrollados en cada tipo de interacción son afirmadas con particular énfasis en antibiosis, competencia, parasitismo, e inducción de resistencia. El significado de promoción de crecimiento y biocontrol también son considerado. La extrema complejidad de las interacciones que ocurren en la rizosfera es altamente potencial (Whipps 2001).

#### 4.5. Características de las bacterias

Son microorganismos unicelulares, de forma diferente y hábitat variable. Algunas son capaces de formarse una envoltura o cápsula. Todas se multiplican por división. Algunas bacterias son capaces de formar endosporos más resistentes a las formas adversas de vida. El oxígeno es indispensable para las bacterias aeróbicas y resulta nocivo para las anaeróbicas que lo toman de compuestos oxigenados. Las bacterias son capaces de generar mutantes, la longitud promedio de la célula bacteriana es aproximadamente 5 micras. Se pueden clasificar, atendiendo a su forma, en cocos (esféricas), bacilos (bastones rectos) y espirilos (bastones curvos). Solamente el 1% de las bacterias produce enfermedades las demás bacterias tienen funciones útiles para la vida (Salas 2006). Dentro de este pequeño grupo de bacterias denominadas fitopatógenas lo normal es que cada especie solo sea capaz de infectar a un grupo muy reducido de plantas huéspedes (Murillo y Rodríguez 1995). Las bacterias son de vital importancia y útiles para la humanidad (Salas 2006).

#### 4.6. Bacterias endofíticas

Las bacterias endofíticas han sido definidas por (Hallmann *et al* 1997) como bacterias que pueden ser aisladas desde superficies desinfectadas de tejidos de plantas donde los daños no son visibles. Pueden ser beneficiosas como controladoras de crecimiento y para el control biológico. Ya desde 1952, bacterias antagonistas de la rizosfera tales; como *Bacillus spp.* y *Pseudomonas fluorescens* han sido utilizados para el control de bacterias dañinas en tomate y papa (Anuratha y Gnanamanickam 1990).

Las bacterias endofíticas han sido recientemente un foco de interés como agente de biocontrol. Tales bacterias colonizan el tejido local o sistémico o bien ambos tejidos intercelulares e intracelulares (Hallmann *et al.* 1997). Bacterias endofíticas están predominantemente reclutadas desde la rizosfera (Mahaffee y Kloepper 1997) donde ellos presumiblemente usan heridas y aberturas naturales para entrar a la planta. Enzimas producidas por estas bacterias pueden también contribuir a una eficiente penetración y colonización. Una vez las colonias internas adicionan beneficios como agentes biocontroladores, las plantas les proveen refugio y nutrientes. Las bacterias se van

desarrollando dentro de la planta, en condiciones competitivas contra patógenos. A través de la bacteria que resulta mediadora –inductora de resistencia– por la asociación formada entre bacteria endofítica y la planta pueden que resulta ser más fuerte la protección de la planta (Hallmann y Kloepper 1996).

Investigaciones acerca del modo de acción de las rizobacterias han demostrado que ellas promueven el crecimiento de la planta de dos maneras; una es forma indirecta, ya que las rizobacterias benéficas reducen la actividad de los hongos y de bacterias patogénicas del rizoplasma. Tal promoción indirecta puede ser considerada como un control biológico, aún cuando esto no necesariamente está asociado con control de patógenos (Kloepper y Schroth 1981). Algunas rizobacterias promueven directamente el crecimiento de la planta por la producción de metabolitos que estimulan a la planta, independientemente de los microorganismos nativos del suelo; esto se debe supuestamente a que la rizobacteria al acelerar las tasas de crecimiento, hace que las raíces escapen a la enfermedad (Kloepper *et al.* 1990). Los efectos benéficos de las rizobacterias han sido documentados por algunos grupos de investigadores, que pueden resumirse así: (1) promoción directa de crecimiento de las plantas, (2) control biológico de enfermedades, e (3) inducción de resistencia contra enfermedades (Tzum y Kloepper 1995).

#### **4.7 Interacción bacteria-bacteria**

En los últimos años se han venido realizando estudios de la aplicación de bacteria a semillas y raíces controlando enfermedades. Un ejemplo es la aplicación de cepas no patogénicas de *Streptomyces* para el control de la roña de la papa (*Solanum tuberosum L*) causado por *Streptomyces scabies* (Thaxter). Este biocontrol puede operar a través de antibiosis o competencia por nutrientes y espacio dentro de la rizosfera (Ryan y Kinkel 1997; Neeno-Eckwall y Schottel 1999).

En otro estudio, *Pseudomonas fluorescens* (Trevisan) Migula F113 fue presentada para el control de pudrición de la raíz de la papa producida por *Erwinia carotovora* subsp. *Atroseptica* (van Hall). Evidencia obtenida por la producción de sideróforos por parte de *Pseudomonas fluorescens* F113 podría ser un rol para el biocontrol de la pudrición de la raíz

de la papa sobre suelo con limitaciones de hierro. Especies de *Pseudomonas* podrían también controlar enfermedades que producen agallas en muchas dicotiledóneas que son atacadas por el agente patógeno *Agrobacterium tumefaciens* (Smith y Townsend) Conn (Khmel *et al.* 1998).

#### 4.8 Interacción bacteria-hongos

El volumen de literatura en esta área continúa aumentando a una proporción rápida, estimulado por la facilidad creciente con que pueden aplicarse las técnicas moleculares para contestar las preguntas acerca de la distribución y la ocurrencia e importancia de los modos específicos de acción. Algunos ejemplos de los diferentes tipos de interacción bacteria-hongos han sido examinados en la rizosfera por tres años (Whipps 2001). *Bacillus* spp, contra patógeno del suelo *Rhizoctonia solani* var. tritici, en el cultivo de trigo; *Bacillus subtilis* (GB03) contra el patógeno del suelo *Fusarium oxysporum* f.sp. ciceris, en el cultivo del garbanzo; *Pseudomonas aureofaciens* AB244 controlando *Phytophthora ultimum* en tomate; *Pseudomonas fluorescens* contra *Fusarium oxysporum* f.sp. raphani en el cultivo del rábano (Hervas *et al.* 1998, De Boer *et al.* 1999, Ryder *et al.* 1999, Warren y Bennett 1999). Resultados obtenidos han sido similares con *Pseudomonas fluorescens* aislada de la rizosfera de banano usada para evaluar la eficacia contra el hongo *Fusarium oxysporum* cubense in vitro, se demostró que tuvo una acción inhibitoria en el crecimiento del hongo (Saravanan 2004).

#### 4.9 Interacción bacteria-nematodos

Existen dos modos de acción de las bacterias sobre nematodos: el parasítico y la acción química. Aún cuando se han encontrado diversas bacterias asociadas a los nematodos, el caso de la bacteria *Pasteuria penetrans* parasitando a los nematodos es el mejor documentado y con un gran potencial como biocontrolador, aún mayor que el de muchos hongos. *Pasteuria penetrans* pertenece a un grupo de bacterias formadoras de endosporas patogénicas a varios nematodos pero, principalmente, ha sido estudiada contra *Meloidogyne* (López 2004).

El nematodo del quiste de la papa (*Solanum tuberosum*) producido por *Globodera rostochiensis* es una de las plagas más importantes de este cultivo. *Pseudomonas fluorescens* F113 que produce 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) fue investigado como un potencial controlador biológico de *G. rostochiensis*, reduciendo la movilidad de juveniles y la incubación del huevo (Cronin *et al.* 1997).

Hallman *et al.* (2001) realizaron investigación sobre colonización endofítica de plantas con el agente biocontrolador, *Rhizobium etli* G12 en relación con la infección de *Meloidogyne incognita* las bacterias fueron encontradas en la parte interna del rizoplasma, preferencialmente colonizando la raíz y agallas causadas por *Meloidogyne incognita*.

#### **4.10. Bacterias promotoras de crecimiento**

El concepto de Rizobacterias Promotoras de Crecimiento (Plant growth-promoting rhizobacterium, PGPR) fue establecido por Bashan (1998) considerado y relacionado al biocontrol. Las PGPR aumentan el crecimiento en las plantas indirectamente. Alternativamente pueden influir en el aumento de crecimiento de las plantas de otra manera por ejemplo, asociadas como fijadoras de nitrógeno, solubilización de nutrientes tales como el fósforo (P), promoviendo la función de las micorrizas, regulando la producción de etileno en las raíces, liberando fitohormonas y disminuyendo toxicidad de metales pesados (Burt *et al.* 1998).

Se ha sugerido que este grupo deben reclasificarse en el biocontrol de la planta y como promotoras de crecimiento. El concepto de PGPR se establece ahora bien para que sea considerado como biocontrol pues las PGPR, indirectamente, aumentan el crecimiento de la planta, por lo tanto la supresión de enfermedades muy conocidas causadas por patógenos mayores y reduciendo los efectos deletéreos de patógenos (microorganismos menores que reduce el crecimiento de la planta pero sin los síntomas obvios). El modo independiente de acción es una clave importante de PGRP, es que todos colonizan las raíces de alguna magnitud. Durante los años 80, se trabajó en el modo de acción de PGRP y de la actividad biológica, sugiriendo que activan sistemas de defensa (Scheffer 1983).

Evidentemente, se concluye que PGPR permanece en las raíces de la planta donde pueden inducir la resistencia a la planta contra patógenos sistémicos (Wei *et al.* 1991). Endofíticos en raíces han sido registrados de PGPR, tales como *Bacillus polymyxa* y *Pseudomonas fluorescens* en varios cultivos. Estas bacterias endofíticas pueden estar en la posición ecológica ventajosa ya que pueden crecer y competir en la superficie de la raíz, puede ser capaces de desarrollarse dentro de la raíz relativamente protegidas del competidor y en el medio ambiente de alto-tensión de la tierra; de hecho muchas semillas, raíces y tubérculos normalmente son colonizados por las bacterias endofíticas (Kloepper *et al.* 1990).

Por otro lado, se ha demostrado que en las raíces de las plantas se establecen relaciones simbióticas con comunidades de microorganismos específicos, los cuales son atraídos mediante exudados que son producidos por la planta y que son emitidos mediante la endorriza (Sikora 2003). Por esto microorganismos específicos logran colonizar las raíces y desencadenan reacciones de defensa en las plantas hospedantes. Este tipo de mecanismos de defensa activados son conocidos como Resistencia Sistémica Inducida (ISR) o Resistencia Sistémica Adquirida (SAR), donde la señal estimuladora es capaz de inducir la síntesis y acumulación de ácido salicílico(SA) y/o de etileno, que actuarían como mensajeros secundarios para la producción de fenilpropanoides (Pieterse 2001).

La ruta biosintética de los fenilpropanoides es muy importante para los mecanismos de defensa de la planta, ya que los productos intermediarios generan como compuesto final la lignina, necesaria para el reforzamiento de las paredes celulares. Asimismo, productos del metabolismo secundario llevan a la obtención de fitoalexinas, que se encuentran involucradas con el bloqueo de los patógenos. Se considera que estas respuestas inducibles en la planta son mecanismos de defensa contra los fitonematodos (Wuyts 2003).

Jaizme (1998) documentó que una inoculación micorrítica temprana en el cultivar Gran enano incrementó la tolerancia a *Radopholus similis*. Esta protección se explica muy probablemente por el trabajo extra de bacterias promotoras de crecimiento, liberadas durante la interacción micorriza-planta, que estimulan de forma directa el crecimiento vegetativo y activan los mecanismos de defensa hacia el ataque de fitonematodos.

#### 4.11. Características de *Pseudomonas fluorescens*

El metabolismo de *Pseudomonas fluorescens* es aeróbico y el oxígeno actúa como aceptor de electrones terminales. Esta bacteria degrada la glucosa y otros carbohidratos por oxidación, producen una amplia variedad de enzimas, entre ellas las oxidasas y catalasas, colonizan abundantemente el suelo, plantas y animales. Las *Pseudomonas* participan en la nitrificación, proceso microbiológico mediante el cual el  $\text{NH}_4$  es oxidado a  $\text{NO}_3$  (Blandón 1996). Igualmente están consideradas como solubilizadoras de fósforo. Kloepper *et al.* (1990) describe a *Pseudomonas fluorescens* como una bacteria asociada al filoplano y a la rizosfera. Si la bacteria es introducida en la semilla o material de siembra puede controlar enfermedades patogénicas del suelo y promover el crecimiento al suprimir otro organismo dañino. Varios aislamientos de *P. fluorescens* presentan dos tipos de antibióticos feril pirrolleclorinados, uno de ellos con acción inhibitoria contra oomicetes (Howell y Stipanovic 1980). Pueden tener un efecto inductor, mediante algún producto de su mecanismo que genera en las plantas mecanismos de protección y defensa contra organismos patógenos (Cook 1991).

#### 4.12. Características de *Bacillus thuringiensis* y sus toxinas insecticidas

*Bacillus thuringiensis* (Bt) es una bacteria Gram-positiva, aerobia estricta, morfológicamente relacionada con *Bacillus cereus* y *Bacillus anthracis*. Estas tres especies bacterianas, durante su ciclo de vida presentan dos fases principales: la fase de crecimiento vegetativo, en donde las bacterias se duplican por bipartición cada 30-90 min, dependiendo del medio de cultivo y la fase de esporulación, la cual es un programa de diferenciación de bacteria a espora (Helgason *et al.* 2000). El programa de diferenciación consta de siete estadios, se dispara cuando la bacteria se encuentra en limitación de nutrientes (Bechtel y Bulla 1976). La espora es una forma de vida latente que puede permanecer en el ambiente por periodos de tiempo muy largos (años) en ausencia de humedad y nutrientes. Cuando la espora se encuentra de nuevo en un medio rico que contenga los nutrientes necesarios puede germinar para comenzar de nuevo el crecimiento vegetativo.

*Bacillus thuringiensis* es considerada una bacteria ubicua ya que se ha aislado de todas partes del mundo y de muy diversos sistemas como suelo, agua, hojas de plantas, insectos muertos, telarañas, etc. A *Bacillus thuringiensis* (Bt) se le diferencia de *B. cereus* y *B. anthracis* por contener un cuerpo paraesporal conocido como cristal, el cual es de naturaleza proteica y



tiene propiedades insecticidas. Está constituido por proteínas denominadas  $\alpha$ -endotoxinas también conocidas como proteínas Cry y Cyt. Se han encontrado  $\alpha$ -endotoxinas activas contra insectos lepidópteros (mariposas), coleópteros (escarabajos), dípteros (mosquitos), himenópteros (hormigas), ácaros y también contra otros invertebrados como nemátodos, gusanos planos y protozoarios (Feitelson 1993). Se ha demostrado que después de ser activadas, las proteínas Cry se unen a sitios específicos localizados en la micro vellosidad de las células columnares del intestino medio de las larvas de insectos susceptibles: lepidópteros (Hofmann *et al.* 1988), coleópteros y dípteros (Bravo *et al.* 1992).

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1. Localización del estudio**

Se hicieron un muestreo de 6 fincas comerciales de banano de la Zona Atlántica de Costa Rica, propiedad de la Compañía de Desarrollo Agrícola DelMonte (CDADM): Duacari 2, Frutera, Carmen 1, Carmen 2, Imperio, Monte Líbano. Las seis fincas en estudio se dividieron a su vez en dos, para un total de 12 fincas.

El aislamiento y purificación de las bacterias se llevó a cabo en los laboratorios de Nematología del CATIE, ubicado en el cantón de Turrialba en la provincia de Cartago, Costa Rica, localizado a 9° 52' de latitud norte y 83° 38' de latitud oeste y a una altura de 602 msnm, temperatura promedio de 21.6°C, 87% de humedad relativa y una radiación promedio mensual de 17 kJ M<sup>-2</sup> día<sup>-1</sup>.

El estudio se realizó en 3 fases.

1. Al nivel de campo: se realizó un muestreo y se evaluaron 12 fincas comerciales de banano.
2. Laboratorio: se aislaron las bacterias endofíticas y se identificaron realizando pruebas de colonización, crecimiento y biocontrol.
3. Invernadero: utilizando vitroplantas se realizó evaluación de promoción de crecimiento y antagonismo con las bacterias endofíticas de mayor potencial.

## 5.2 Selección de sitios de muestreo

El material vegetal muestreado fueron raíces de banano del subgrupo Cavendish, sembradas en las fincas en estudio. De las 12 fincas comerciales de banano *Musa* (AAA) se dividió en dos sitios y/o zonas (alta producción y baja producción). De cada zona se tomaron 6 puntos de muestreo. Cada muestra estaba conformada por raíces de 5 plantas (muestra compuesta) seleccionadas al momento de la floración. Las raíces se toman de una excavación de 15 cm. de largo x 15 cm de ancho x 30 cm. de profundidad a una distancia de 10 cm. frente al hijo de sucesión de la mata de banano. Las raíces se transportaran en bolsas plásticas debidamente identificadas antes de ingresarlas al laboratorio.

## 5.3. Aislamiento y obtención de bacterias endofíticas

Las raíces fueron lavadas y clasificadas, en raíces funcionales y no funcionales. Se pesaron 10 gr de raíces funcionales, las que se cortaron en secciones de 2 cm en una cámara de transferencia, luego se procedió a la esterilización superficial en NaOCl al 2.5% por 3 minutos y se lavaron con agua destilada esterilizada tres veces. Seguidamente se colocaron las raíces en papel toalla esterilizada para que el segmento quedara completamente seco. Se tomaron las muestras y se maceraron con un mortero, hasta que quedará una mezcla homogénea, a la vez que se le agregaba 10 ml de la solución buffer (Hidróxido de potasio 0.01M) con un pH 7.4.

En tubos de ensayo con agua destilada esterilizada, se procedió a preparar las diferentes diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$ . Posteriormente con una micro pipeta, se colocaron 100  $\mu$ l de la dilución y con una asa esterilizada se dispersó suavemente por el medio de los platos Petri con Agar Nutritivo (AN) al 10%. Los platos Petri se sellaron con papel parafilm y se incubaron a 25°C, por un tiempo de 24 y 48 horas. Una vez obtenidos los diferentes aislados provenientes de los tejidos internos de las raíces fueron transferidas las colonias a un medio nutritivo (AN) 100%. Posteriormente se colocaron en la incubadora a 25°C, para luego hacer la selección de colonias ya formadas de acuerdo a diferentes pruebas bioquímicas.



*Figura 1. Metodología utilizada para extraer las bacterias endofíticas de los tejidos internos de las raíces.*

### **5.3.1 Preparación de medios de cultivos para bacterias**

Para preparar el medio de cultivo se utilizó agar nutritivo(AN) al 100% como fuente de alimento para las bacterias. Se colocó un litro de agua destilada en un beaker de 1000 ml, el cual se calentó en un agitador (Fisher termix modelo 210T de seis velocidades). Una vez que el agua alcanzó el punto de ebullición se agregaron 23 g de Agar nutritivo más 6 g de Agar para solidificar el medio. Luego de homogenizada la solución, se dividió en Erlenmeyers de 250 ml tapándolos con papel aluminio, se esterilizaron en la autoclave (Market Forge), sometiéndolas a una presión de 15 lbs/pulgada<sup>2</sup> y a una temperatura de 121°C por 30 minutos. Los Erlenmeyer de 250 ml con la solución ya esterilizada se traspasaron a la cámara de flujo laminar (Edge Card Hood), la solución se distribuyó en platos Petri 90x15 mm, aproximadamente 24 ml en cada placa.

### **5.4. Pruebas bioquímicas para identificación de bacterias**

#### **5.4.1. Prueba de KOH**

Esta prueba se basó en la resistencia de la pared celular de las bacterias gram positiva al tratamiento con una solución de hidróxido de potasio (KOH) al 3%. Se colocó una gota de KOH en un porta objetos, con una asa estéril se toma una porción pequeña de masa bacterial y se mezcló en forma rotacional con la gota de KOH. Después de 10 segundos de exposición al KOH si aparecía la masa viscosa era Gram negativa, si no aparecía era Gram positiva (Bustamante 1993).

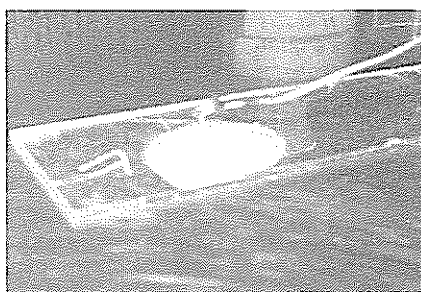


Figura 2. Prueba de KOH para determinar bacterias Gram- y Gram +

#### 5.4.2 Prueba de *Bacillus*

Esta prueba se realizó para separar las *Pseudomonas* de los *Bacillus*, ya que estas últimas forman esporas (endosporas) resistentes al calor (Buchanan y Gibbons 1974). Se colocaron en baño de María a 80 °C por 10 minutos en tubos de ensayo, una solución de bacterias en agua destilada estéril. Luego de rayarlos en los platos Petri con Agar Nutritivo, se colocaron en la incubadora, las colonias que crecieron de nuevo después de baño de María fueron clasificadas como *Bacillus*. La reacción positiva a la prueba se confirmó en los platos con crecimiento bacterial en AN a las 48 h de incubación (Okumoto 1992).

#### 5.4.3. Medio específico B-KING

Para la identificación de *Pseudomonas* se preparó el medio específico K-Bing, (Anexo 3) donde se rayaron para ser seleccionadas, (colonias que producían fluorescencia), durante 24 horas, a 25°C. Posteriormente se realizó una selección de colonias utilizando como parámetro principal la fluorescencia de éstas, la cual fue verificada en una lámpara de luz ultravioleta de 365 nm.

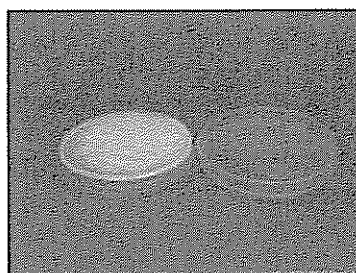


Figura 3. *Pseudomonas spp.* vista en una cámara de luz ultravioleta de 365 nm. comparada con una *Bacillus spp.*

### **5.5. Caracterización morfológica**

La forma, elevación, color y el tipo de borde que caracterizaba el crecimiento de las colonias de bacterias se utilizaron para una clasificación preliminar. Por lo cual se hizo una descripción morfológica de la forma y color obtenidos de las bacterias.

### **5.6. Aislamiento y purificación de bacterias**

Las colonias de las bacterias endofíticas se rayaron en Agar Nutritivo (AN); las que presentaban características morfológicas semejantes de color y forma, fueron sometidas a pruebas bioquímicas de *Bacillus*, ver numeral 5.4.2 y/o cultivadas en medios específicos (B-King) para ser observadas en cámara de luz ultravioleta, prueba para *Pseudomonas* ver numeral 5.4.3 para su selección.

### **5.7. Selección de bacterias endofíticas como promotoras de crecimiento y potencial antagonista contra *Radopholus similis*.**

#### **5.7.1. Reproducción de bacterias seleccionadas.**

Dentro de la cámara de flujo laminar, debidamente identificadas, se seleccionaron 64 bacterias con base en su habilidad de recuperación del stock de almacenamiento y su rápido crecimiento en AN. Las bacterias seleccionadas se rayaron en sus medios correspondientes, separando los *Bacillus* en medio de Agar Nutritivo (AN) y *Pseudomonas* en medio específico de B-King. (Anexo 3), luego fueron almacenadas a temperaturas de 25°C, para una próxima evaluación.

### **5.8. Cultivo aséptico de *Radopholus similis***

Cultivos puros de *R. similis* provenientes del Laboratorio de Nematología (CATIE), fueron subcultivados para su reproducción en discos de zanahoria según la metodología descrita por Speijer y De Waele (1977) y O Bannon (1968). Estos cultivos se dejaron aproximadamente seis semanas en una cámara oscura, a una temperatura de 27°C. Los nematodos móviles que se encontraban en la superficie de los Petri (35mm) fueron colectados para su transferencia a nuevos discos de zanahoria.

### **5.8.1. Preparación de discos de zanahoria estériles para la reproducción de *Radopholus similis***

Bajo condiciones estériles, zanahorias frescas previamente desinfectadas con detergente líquido, fueron asperjadas con alcohol al 70% y flameadas por tres veces consecutivas. En papel servilleta autoclavado, se procedió a cortar transversalmente en discos de 3 a 5 mm aproximadamente con un bisturí previamente flameado. Cada disco fue transferido con pinzas estériles a platos Petri de 35 mm y sellados con papel parafilme.

### **5.8.2 Inoculación de los discos de zanahoria con *Radopholus similis***

Los nematodos visibles en la superficie de los discos de zanahoria se lavaron con agua estéril. La solución fue recolectada en viales estériles por medio de una pipeta. Por cada dos milímetros de suspensión de nematodos, se utilizó un milímetro de Sulfato de estreptomicina (solución líquida de 2000 ppm) para esterilización. Se dejaron reposar por media hora hasta que se formara un precipitado de nematodos y fuera posible remover el sobrenadante. Posterior a esto, se lavaron por tres veces, aplicando agua estéril y dejando reposar hasta la formación de precipitado. Se procedió a remover nuevamente el sobrenadante a modo de dejar la mayor concentración de individuos en el menor volumen posible de agua. Posteriormente a la desinfección de los nematodos, seis gotas de la solución de nematodos fueron depositadas en las orillas de los discos de zanahoria estériles. Estos cultivos fueron almacenados en incubadoras, bajo condiciones de oscuridad a 27°C.

## **5.9 Preparación del sustrato**

El sustrato para la siembra de plantas de banano que se usó es una mezcla 1:1 de suelo y arena tamizados. Este material se esterilizó en la autoclave (Market Forge) a una presión de 15lbs/pulgada<sup>2</sup> con una temperatura de 121°C por 60 minutos. Se dejó enfriar 24 horas para su uso posterior.

## **5.10 Material vegetal**

Las plantas utilizadas para el experimento son vitro-plantas de banano del grupo Cavendish cultivar Gran Enano y cultivar Williams, con seis semanas de endurecimiento en invernadero, proporcionadas por el invernadero Cristal ubicado en Siquirres, Limón. Los cultivares Gran Enano y Williams, son los más usados comercialmente en Costa Rica.

## **5.11 Selección de bacterias endofíticas utilizadas para las pruebas de penetración y colonización**

### **5.11.1. Inoculación de vitro plantas con bacterias endofíticas**

El sistema radical fue inmerso en una suspensión de bacterias seleccionadas a una concentración de  $10^6$  ufc, contenido en un beaker de 2000 ml de capacidad. Las vitroplantas se dejaron sumergidas, agitándolas levemente, por un tiempo de cinco minutos. Inmediatamente, se sembraron en los vasos plásticos, conteniendo suelo estéril (descrito en el numeral 5.9). Las plantas se dejaron bajo condiciones de invernadero.

### **5.11.2. Prueba de colonización:**

La prueba consiste en inocular plantas in-vitro con los 64 aislamientos seleccionados para evaluar colonización. Se prepararon soluciones con agua destilada esterilizada con una concentración de  $10^6$  ufc para cada una de las bacterias (con un hematocimetro). Se utilizaron vitro plantas de banano de la variedad Gran Enano de 4 semanas de edad. Las plantas crecieron en invernadero durante 10 días, para luego sacarlas y realizar las pruebas de colonización de la siguiente manera:

- Lavar las raíces y cormo
- Dividir el material de raíces, cormo, tallo y hoja y se trasladan a la cámara de flujo laminar (Edge Card Hood) para desinfectarlos.
- Desinfectar el material dentro de la cámara de flujo laminar (Edge Card Hood). Se prepararon 12 recipientes esterilizados para cada planta, cuatro con hipoclorito de sodio al 2% y ocho con agua destilada esterilizada.
- Colocar los segmentos de planta, en su respectivo recipiente con hipoclorito de sodio al 2% por 2 minutos.
- Trasladar a otro recipiente que contenía agua destilada esterilizada, por 2 minutos y de nuevo a otro recipiente con agua destilada esterilizada por 2 minutos.
- Terminada la desinfección se colocaron las piezas en papel toalla esterilizada para que se sequen y seleccionar el mejor material.
- Los segmentos de raíces, cormo, tallo y hoja escogidos se cortaron en 5 pedacitos y se colocaron en PDA al 10%. Se incubó durante 48 horas.

- A las 48 horas se revisó el material colonizado y se obtuvo el porcentaje de colonización de cada planta. Cada segmento de raíz, cormo, tallo u hoja a la cual se le encontraba la bacteria inoculada representa un 5%.

### **5.11.3. Prueba de penetración**

Un total de 64 aislamientos de bacterias endofíticas fueron evaluadas para determinar la reducción de *R. similis* en plantas protegidas con bacterias y la influencia que estas tienen en controlar la penetración de nematodo. A partir de los resultados de las pruebas efectuadas, se seleccionaron las bacterias presentes en el cuadro 5. Seguidamente se procedió a inocular las vitroplantas con bacterias endofíticas de acuerdo al numeral 5.12.

### **5.11.4. Inoculación del material vegetativo con *Radopholus similis***

Cuando los nematodos fueron observados en colonias grandes en la superficie de platos Petri y el perímetro de los discos de zanahoria, estos se removieron con agua destilada y fueron decantados en Erlenmeyer con la ayuda de una pipeta. La solución obtenida del lavado fue aforada a un volumen conocido y se procedió a determinar la concentración de nematodos por ml. La solución fue ajustada a una suspensión de 500 nematodos/6ml de agua en un Erlenmeyer de 2000ml. A los 7 días de la inoculación con la suspensión de bacterias se efectuó la inoculación con los 500 nematodos por planta. La inoculación se efectuó con la aplicación de 6 ml de la suspensión mediante una pipeta Eppendorf calibrada. Estos se inocularon en tres agujeros hechos en la circunferencia del área radical de la planta, y para asegurar que la aplicación de nematodos fuera homogénea en cada planta, la suspensión fue agitada continuamente.



### 5.11.5. Extracción de nematodos

Se utilizó la metodología de macerado y filtrado utilizada en el Laboratorio de Nematología de la Corporación Bananera Nacional (CORBANA S.A) que es una adaptación al método Taylor y Loegering.

- Se lavaron, cortaron y pesaron las raíces.
- Luego se licuaron (licuadora Hamilton Beach, de dos velocidades) por cinco segundos en velocidad baja y cinco en velocidad alta.
- El contenido se tamizó en un juego de cribas. Se tamizaron en el tamiz de 50 por dos minutos, en el tamiz de 100 por un minuto y el resto que quedó en el tamiz de 500 se completo con agua a los 100 cc en un contenedor.
- Para el conteo de nematodos se tomaron alícuotas de 2 ml después de homogeneizar la suspensión y se transfirieron a micro cámaras de conteo. Se realizaron dos conteos de nematodos por alícuota en el microscopio.
- A partir de los nematodos cuantificados por alícuota, se estimó la cantidad total de nematodos por 100g de raíz a través de una extrapolación con el volumen total.

### 5.12. Experimentos a evaluar

De las bacterias endofíticas seleccionadas se tomaron para evaluar promoción de crecimiento y actividad antagonista hacia *Radopholus similis* dos variedades: Gran Enano y Williams.

### 5.13. Biocontrol del nematodo *Radopholus similis*.

Se evaluaron en invernadero 30 aislados de bacterias clasificadas en dos grupos; 15 *Bacillus* y 15 *Pseudomonas* (Cuadro 7). Se procedió a inocular las vitroplantas con una suspensión de cada una de las bacterias seleccionadas siguiendo el proceso descrito en el numeral (5.12). A las 3 semanas de crecer en el invernadero se procedió a inocular el material vegetativo con *Radopholus similis*, siguiendo, los procesos descritos en el numeral (5.15) manteniéndolas en el invernadero por 6 meses. Los nematodos utilizados para esta prueba fueron extraídos del sistema de reproducción basado en discos de zanahoria, trabajados durante el transcurso de esta investigación. Este proceso es descrito en la sección (5.8.1 y 5.8.2).

### **5.13.1. Descripción de los tratamientos**

La evaluación in vivo consistió en 30 tratamientos, representados por cada una de las bacterias seleccionadas. Los tratamientos testigo consistían en control absoluto (TA) sin nemátodos ni bacterias; un control solo con nematodos (SN), y control químico (TQ) con aplicación de Counter (Terbusfos), mezclándolo con el suelo un día antes de montar el experimento con una dosis de 10 ppm equivalente a la muestra, el nematicida seleccionado es el más utilizado en las plantaciones comerciales de banano. Después del tiempo establecido (6 meses) se sacaron las plantas de las bolsas y se procedió a la extracción y conteo de nematodos descritos en el numeral 5.16.

### **5.13.2. Variables respuesta**

1. Número de nematodos: Se contó el número de nematodos vivos extraídos de las raíces de cada uno de los tratamientos.
2. Peso del sistema radical
3. Peso aéreo de la planta
4. Peso total de la planta

### **5.14. Promoción de crecimiento.**

Se procedió a inocular las vitroplantas con una suspensión de cada una de las bacterias seleccionadas siguiendo el proceso descrito en el numeral (5.12). Antes de evaluar las plantas, se midieron la altura (cm) y diámetro basal del sistema foliar, y el número de hojas. Las plantas fueron trasladadas al laboratorio de raíces del CATIE, donde fueron removidas de las bolsas. Se procedió a un lavado del sistema radical con un caudal de agua con poca presión para evitar el desprendimiento y pérdida de los pelos radicales. Posteriormente, las plantas se colocaron en papel toalla para remover el exceso de humedad. Las raíces fueron cuantificadas y separadas del sistema foliar mediante un bisturí, y se colocaron en recipientes plásticos debidamente rotulados. Posteriormente, el sistema foliar y las raíces se pesaron en una balanza analítica de 0,01g de precisión. Las raíces fueron almacenadas en agua, de manera que el tejido se mantuviera turgente para una adecuada extracción de nematodos.

La morfología de raíces fue analizada mediante un escáner Hewlett Packard Scan Jet 6100C/T del software WinRhizo. Las raíces de cada planta se colocaron lo mas extendidamente en bandejas de 10x30cm, donde fueron escaneadas para el análisis de las variables diámetro promedio (mm), longitud total (cm) y longitud/volumen (cm. /m<sup>3</sup>)

#### **5.14.1. Variables respuesta**

1. Peso radical
2. Peso aéreo.
3. Largo promedio de raíces.
4. Grosor promedio de raíces
5. Volumen promedio de raíces
6. Promedio del largo de las raíces según el grosor de las mismas

#### **5.15. Diseño experimental y análisis estadísticos**

Para realizar el análisis de varianza del potencial de antagonismo (numeral 5.13) y promoción de crecimiento (numeral 5.14) se utilizó un Diseño de Parcelas Completamente al Azar con 5 repeticiones para cada tratamiento. El modelo del ANOVA fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \epsilon_{ij}$$

Donde:

$Y_{ij}$  = es la variable respuesta

$\mu$  = es la media general

$T_i$  = es el efecto del  $i$ -ésimo tratamiento

$\epsilon_{ij}$  = es el término de error supuestamente distribuido normal e independiente con media cero y varianza constante

Para realizar los análisis se utilizó el programa estadístico SAS (SAS Instituto 2005 versión 8e) e Infostat 2006. Las medias se compararon mediante la Prueba Tukey ( $p < 0.05$ ).

### **5.16. Análisis estadístico para estudio de poblaciones, en diferentes fincas convencionales**

Se realizaron pruebas de Chi-cuadrado, analizando variables de características para medir asociación entre sitio alta producción y sitio de baja producción para las bacterias identificadas en ambos sitios.

a- Pruebas de Chi –cuadrado entre sitios

b- Frecuencias y asociaciones:

- para la distribución de las bacterias halladas en las diferentes zonas
- *Bacillus* en relación con el sitio alto y sitio bajo producción.
- *Pseudomonas* en relación al sitio bajo y sitio alto producción.

d- Pruebas de chi-cuadrado, para la caracterización morfológica:

- Formas de colonias por sitio alto y baja producción, en diferentes diluciones
- Color de colonias por sitio alto y baja producción. y diferentes diluciones.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Diversidad de bacterias endofíticas

El número de aislamientos de bacterias endofíticas encontradas en las doce fincas de banano estudiadas en la presente investigación se ilustran en la figura 4. Un total de 242 aislamientos fueron recobrados tanto de zona de alta y zona de baja producción.

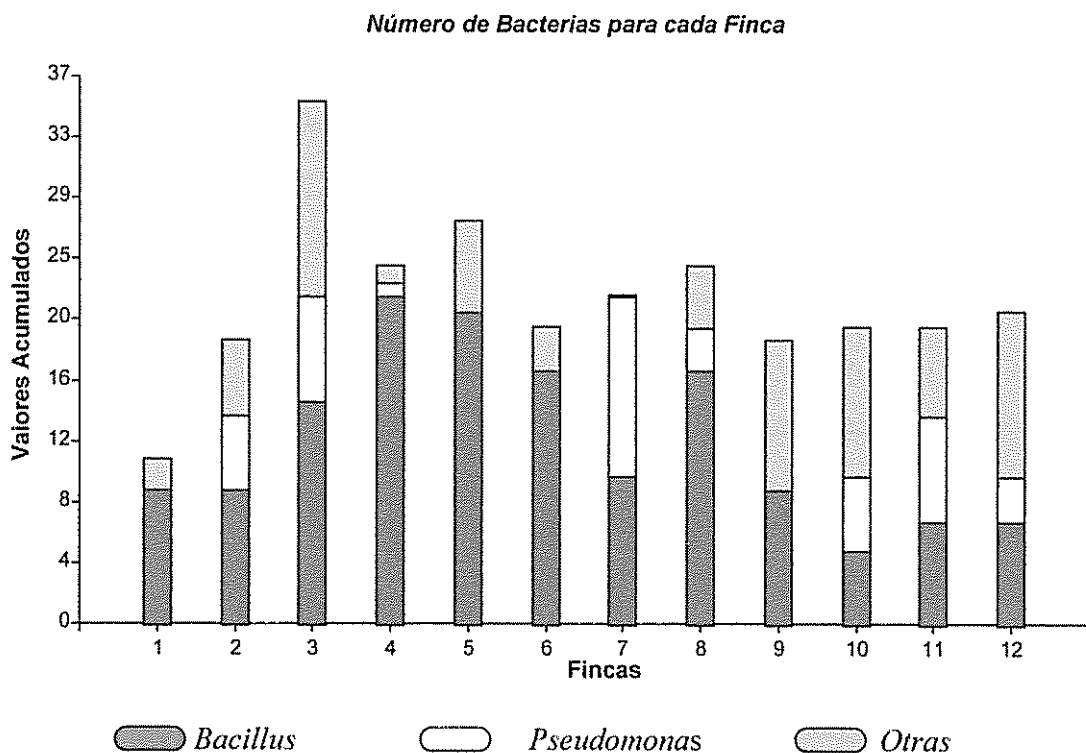


Figura 4. Total de bacterias endofíticas, aisladas por finca convencionales comerciales

De acuerdo a los resultados obtenidos en el proceso de aislamiento y obtención de bacterias endofíticas, el género *Bacillus* fue el dominante en 9 de las 12 las fincas evaluadas, debido a que presentó mayor número de aislamientos encontrados. Por ejemplo en las finca 4 (Imperio finca 5 (Monte Líbano) y finca 6 (Carmen 1) más del 90% de los aislamientos recobrados pertenecieron al género *Bacillus*. En segundo lugar se ubicó el grupo de bacterias no identificadas, y en tercer lugar los aislamientos pertenecientes al género *Pseudomonas*.

Mientras que en la fincas: F-2 (Carmen 2-1), F-3 (Imperio-1), F-10 (Frutera-1), F-11 (Duacari 2-1), F-12 (Duacari 2-2), los valores acumulados, se distribuyeron en los dos géneros identificados, *Bacillus*, *Pseudomonas* y el grupo de bacterias no identificadas denominadas como otras.

El cuadro 1. presenta el porcentaje de frecuencia de aislamiento por género de bacterias endofíticas encontrada en la zona alta de producción y la zona baja de producción de las 12 fincas estudiadas, encontrándose que no existieron diferencias significativas para el sitio de producción. Estos resultados indican que no existió ningún grado de asociación entre el tipo de sitio de producción con mayor o menor frecuencia de hallazgo de las bacterias endofíticas.

*Cuadro 1. Pruebas de Chi cuadrado para medir sitios de producción y presencia de bacterias*

Bacterias	Sitio de Producción		Probabilidad de chi-cuadrado
	% de Identificación		
	Alto	Bajo	
<i>Bacillus</i>	60	54	0.3349
<i>Pseudomonas</i>	14	17	0.2276
Otras	26	29	0.5840
Total (%)	100	100	

## 6.2 Caracterización morfológica (forma y color de las colonias observadas)

*Cuadro 2. Prueba de Chi-cuadrado para comparar las formas de las colonias de las bacterias predominantes encontradas en los sitios de alta y baja producción de las doce fincas estudiadas*

Formas	Alta Producción	Baja Producción	Probabilidad 0.0136
Colonia en cadena	62.71%	37.29%	
Expandida/lisa	58.06%	41.94%	
Expandida/rugosa	100%	0	
Redonda/lisa	46.46%	53.54%	
Redonda/rugosa	100%	41.67%	
Rugosa	58.33%		

Cuadro 3 Prueba de chi-cuadrado para comparar los colores de las colonias de las bacterias predominantes encontradas en los sitios de alta y baja producción de las doce fincas estudiadas

Color	Alta Producción	Baja Producción	Probabilidad 0.0018
Amarilla	66.67%	33.33%	
Blanca	51.02%	48.98%	
Blanca/lechosa	70%	30%	
Crema	68.18 %	31.82%	
Transparente	50%	50%	
Transparente/brillo	0%	100%	

Los cuadros 2 y 3 resumen la comparación de frecuencia de hallazgo en características de forma y el color de las colonias de las bacterias por sitio de producción y las probabilidades de chi cuadrado correspondientes. Para ambas variables cualitativas se encontraron diferencias significativas entre los sitios de producción. Para el sitio de producción alta con excepción de la forma redonda lisa, todas las otras formas de colonias de bacterias fueron más frecuentemente encontradas que en el sitio de baja producción. Siendo las formas expandida - rugosa y colonia en cadena las predominantes, correspondiendo a un 100 y 62.71%, respectivamente. La misma tendencia se encontró para el color de las colonias de las bacterias, donde en el sitio de producción alto, se encontraron mayores porcentajes de hallazgo que en el sitio bajo predominando colonias de color blanco lechoso y crema correspondiendo a 70 y 68.18% respectivamente. Las características morfológicas de forma y color predominantes en el sitio de alta producción están asociadas mayormente con el género *Bacillus*. Por otro lado, las características de color transparente brillo y redonda lisa encontradas con mayor frecuencia en el sitio bajo se asocian mayormente con el género *Pseudomonas*. Las figuras 5 y 6 ilustran la forma y coloración de las colonias de las bacterias encontradas.

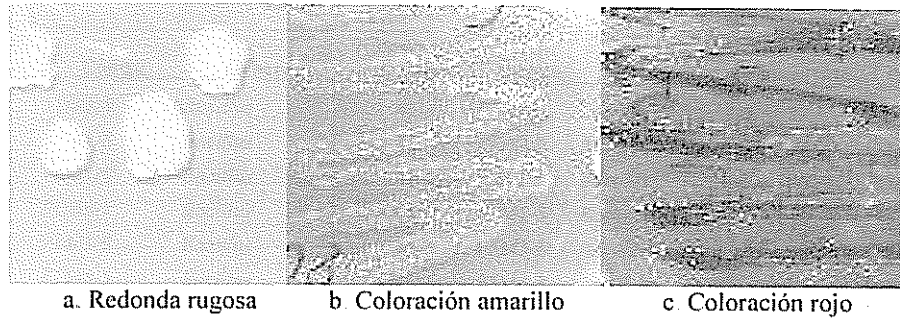


Figura 5. Formas y colores encontrados, para la descripción de las bacterias

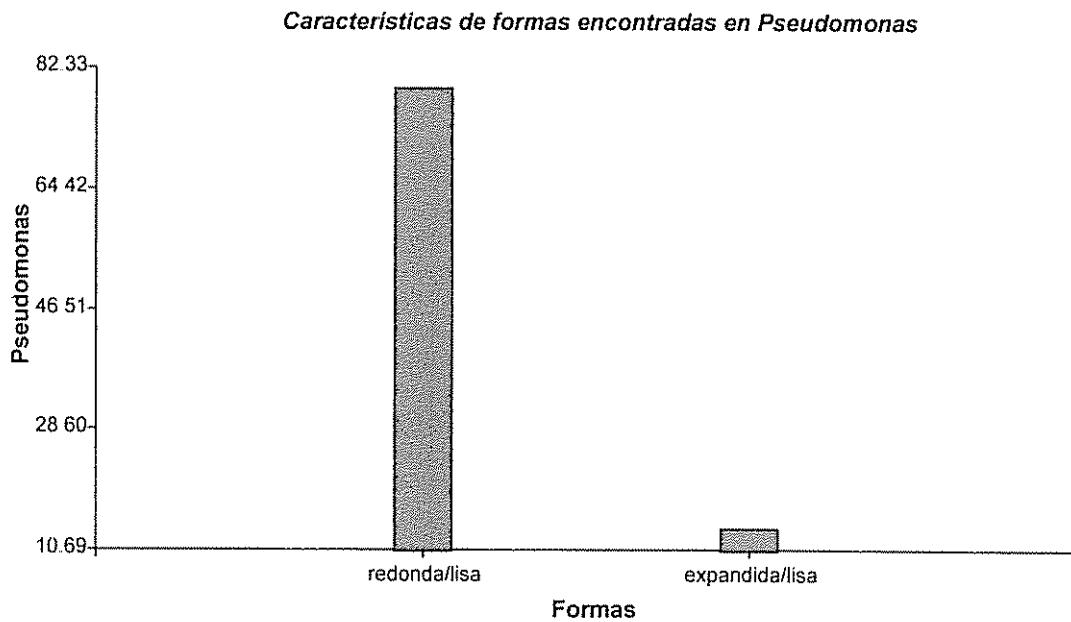


Figura 6. Formas de bacterias endofíticas que predominaron en el género *Pseudomonas*

### 6.3. Purificación de aislamientos de bacterias endofíticas:

De un gran total de 242 aislamientos de bacterias endofíticas provenientes de sitios de alta y baja producción de las 12 fincas comerciales de banano, se lograron purificar 122 aislamientos, de los cuales 97 pertenecientes al género *Bacillus* y 25 al género *Pseudomonas*. (Cuadro 4). De los 122 aislamientos de bacterias se seleccionaron 64: 42 *Bacillus* y 22 *Pseudomonas*, para ser usadas en las pruebas de penetración y colonización.



Cuadro 4. Resultado total de bacterias endofíticas aisladas y purificadas de las 12 fincas

Número del aislamiento	Código	Género	Número del aislamiento	Código	Género	Número del aislamiento	Código	Género
1	F1M1-5	<i>Bacillus</i>	41	F4M6-5	<i>Bacillus</i>	82	F8M3-3	<i>Bacillus</i>
2	F1M4-3	<i>Bacillus</i>	42	F4M4-3	<i>Bacillus</i>	83	F8M4-3	<i>Bacillus</i>
3	F1M5-5	<i>Bacillus</i>	43	F5M1-5	<i>Bacillus</i>	84	F8M5-5	<i>Bacillus</i>
4	F1M6-1	<i>Bacillus</i>	44	F5M2-5	<i>Bacillus</i>	85	F8M6-1	<i>Bacillus</i>
5	F1M3-5	<i>Bacillus</i>	45	F5M3-5	<i>Bacillus</i>	86	F9M1-3	<i>Bacillus</i>
6	F1M4-3	<i>Bacillus</i>	46	F5M4-3	<i>Bacillus</i>	87	F9M3-5v	<i>Bacillus</i>
7	F1M6-5	<i>Bacillus</i>	47	F5M6-5	<i>Bacillus</i>	88	F9M3-5	<i>Bacillus</i>
8	F2M1-5	<i>Pseudomonas</i>	48	F5M5-3	<i>Bacillus</i>	89	F9M1-3	<i>Bacillus</i>
9	F2M2-5	<i>Bacillus</i>	49	F5M1-3	<i>Bacillus</i>	90	F9M5-3	<i>Bacillus</i>
10	F2M3-5	<i>Pseudomonas</i>	50	F5M2-5	<i>Bacillus</i>	91	F9M6-5	<i>Bacillus</i>
11	F2M5-5	<i>Bacillus</i>	51	F5M3-5V	<i>Bacillus</i>	92	F10M1-3	<i>Pseudomona</i>
12	F2M6-3	<i>Bacillus</i>	52	F5M4-3*	<i>Bacillus</i>	93	F10M4-3	<i>Bacillus</i>
13	F2M1-5	<i>Pseudomonas</i>	53	F5M6-3	<i>Bacillus</i>	94	F10M5-5	<i>Pseudomona</i>
14	F2M2-5	<i>Bacillus</i>	54	F6M1-1	<i>Bacillus</i>	95	F10M6-5	<i>Pseudomona</i>
15	F2M3-5	<i>Pseudomonas</i>	55	F6m2-3*	<i>Bacillus</i>	96	F10M1-5	<i>Bacillus</i>
16	F2M5-5	<i>Bacillus</i>	56	F6M3-5	<i>Bacillus</i>	97	F10M2-5	<i>Bacillus</i>
17	F2M6-5	<i>Bacillus</i>	57	F6M4-5	<i>Bacillus</i>	98	F10M4-5	<i>Bacillus</i>
18	F3M1-3*	<i>Bacillus</i>	58	F6M5-3	<i>Bacillus</i>	99	F10M5-5	<i>Pseudomona</i>
19	F3M2-5	<i>Bacillus</i>	59	F6M1-3	<i>Bacillus</i>	100	F10M5-3	<i>Pseudomona</i>
20	F3M3-5	<i>Bacillus</i>	60	F6M2-5	<i>Bacillus</i>	101	F10M6-5	<i>Bacillus</i>
21	F3M3-3	<i>Pseudomonas</i>	61	F6M3-5	<i>Bacillus</i>	102	F11M1-5*	<i>Bacillus</i>
22	F3M5-5	<i>Bacillus</i>	62	F6M5-5	<i>Bacillus</i>	103	F11M3-5	<i>Bacillus</i>
23	F3M6-5	<i>Bacillus</i>	63	F6M6-5	<i>Bacillus</i>	104	F11M4-5	<i>Pseudomona</i>
24	F3M1-1	<i>Pseudomonas</i>	64	F7M1-5	<i>Bacillus</i>	105	F11M5-5	<i>Bacillus</i>
25	F3M1-5	<i>Bacillus</i>	65	F7M2-3	<i>Bacillus</i>	106	F11M6-5*	<i>Pseudomona</i>
26	F3M2-3	<i>Pseudomonas</i>	66	F7M3-1	<i>Bacillus</i>	107	F11M1-5	<i>Pseudomona</i>
27	F3M2-5	<i>Bacillus</i>	67	F7M6-5	<i>Bacillus</i>	108	F11M2-5	<i>Bacillus</i>
28	F3M4-3	<i>Pseudomonas</i>	68	F7M2-1	<i>Bacillus</i>	109	F11M3-5	<i>Pseudomona</i>
29	F3M4-5	<i>Bacillus</i>	69	F7M3-3	<i>Bacillus</i>	110	F11M4-5	<i>Pseudomona</i>
30	F3M5-5	<i>Pseudomonas</i>	70	F7M5-5	<i>Bacillus</i>	111	F11M5-5	<i>Bacillus</i>
31	F3M6-3	<i>Bacillus</i>	71	F7M6-5	<i>Bacillus</i>	112	F11M6-3	<i>Pseudomona</i>
32	F3M6-5	<i>Bacillus</i>	72	F7M4-3	<i>Bacillus</i>	113	F12M1-5	<i>Bacillus</i>
33	F4M1-5	<i>Bacillus</i>	73	F7M6-5*	<i>Pseudomonas</i>	114	F12M1-5	<i>Pseudomona</i>
34	F4M2-5	<i>Bacillus</i>	74	F8M1-1	<i>Bacillus</i>	115	F12M2-1	<i>Bacillus</i>
35	F4M3-5	<i>Bacillus</i>	75	F8M2-3	<i>Bacillus</i>	116	F12M3-5	<i>Bacillus</i>
36	F4M5-5	<i>Bacillus</i>	76	F8M3-5	<i>Bacillus</i>	117	F12M6-3	<i>Bacillus</i>
37	F4M6-5	<i>Bacillus</i>	77	F8M5-5	<i>Bacillus</i>	118	F12M6-5	<i>Bacillus</i>
38	F4M1-5	<i>Bacillus</i>	78	F8M4-5	<i>Bacillus</i>	119	F12M1-3	<i>Bacillus</i>
39	F4M3-5	<i>Pseudomonas</i>	79	F8M6-5	<i>Bacillus</i>	120	F12M4-3	<i>Pseudomona</i>
40	F4M5-3	<i>Bacillus</i>	80	F8M1-5 <sup>o</sup>	<i>Bacillus</i>	121	F12M5-5	<i>Bacillus</i>
			81	F8M2-3	<i>Bacillus</i>	122	F12M5-3	<i>Pseudomona</i>

F= Finca

2= Número de la finca

5= La dilución por la cual se obtuvo la bacteria, se utilizaron tres diluciones:-1,-3-5

A= la zona de producción Alta Producción / B= Baja Producción.

B= *Bacillus* y/o P= *Pseudomonas*

## 6.4 Selección de bacterias endofíticas con actividad antagonista contra *Radopholus similis*

### Resultados pruebas de penetración

Cuadro 5: Porcentaje de penetración de *Radopholus similis* en plantas de Gran Enano 7 días después de la inoculación con los nematodos

Trata	Código	Género	Nematodos		%	Trata	Código	Género	Nematodos		%
			Totales	Penetración					totales	Penetración	
56	B-56	<i>Bacillus</i>	0	p	0	57	P-57	<i>Pseudomonas</i>	21	ijklmnop	4.2
46	P-46	<i>Pseudomonas</i>	3	po	0.6	51	B-51	<i>Bacillus</i>	23	hijklmnop	4.6
52	P-52	<i>Pseudomonas</i>	3	po	0.6	25	B-25	<i>Bacillus</i>	24	ghijklmnop	4.8
62	B-62	<i>Bacillus</i>	3	po	0.6	14	B-14	<i>Bacillus</i>	26	ghijklmnop	5.2
64	P-64	<i>Pseudomonas</i>	3	po	0.6	22	B-22	<i>Bacillus</i>	26	ghijklmnop	5.2
45	P-45	<i>Pseudomonas</i>	5	nop	1	33	B-33	<i>Bacillus</i>	26	ghijklmnop	5.2
59	P-59	<i>Pseudomonas</i>	5	nop	1	47	B-47	<i>Bacillus</i>	26	ghijklmnop	5.2
26	B-26	<i>Bacillus</i>	6	mnop	1.2	24	B-24	<i>Bacillus</i>	27	fghijklmno	5.4
55	P-55	<i>Pseudomonas</i>	6	mnop	1.2	42	B-42	<i>Bacillus</i>	27	fghijklmno	5.4
63	P-63	<i>Pseudomonas</i>	6	mnop	1.2	17	P-17	<i>Pseudomonas</i>	29	efghijklmno	5.8
48	P-48	<i>Pseudomonas</i>	8	lmnop	1.6	7	B-7	<i>Bacillus</i>	30	efghijklmn	6
61	B-61	<i>Bacillus</i>	8	lmnop	1.6	30	B-30	<i>Bacillus</i>	30	efghijklmn	6
28	B-28	<i>Bacillus</i>	9	lmnop	1.8	41	B-41	<i>Bacillus</i>	32	efghijklm	6.4
37	B-37	<i>Bacillus</i>	9	lmnop	1.8	5	B-5	<i>Bacillus</i>	33	defghijkl	6.6
44	P-44	<i>Pseudomonas</i>	9	lmnop	1.8	6	P-6	<i>Pseudomonas</i>	33	defghijkl	6.6
50	B-50	<i>Bacillus</i>	9	lmnop	1.8	53	B-53	<i>Bacillus</i>	33	efghijkl	6.6
54	P-54	<i>Pseudomonas</i>	9	lmnop	1.8	20	B-20	<i>Bacillus</i>	38	cdefghijk	7.6
36	B-36	<i>Bacillus</i>	12	klmnop	2.4	2	B-2	<i>Bacillus</i>	40	bcdefghi	8
40	B-40	<i>Bacillus</i>	12	klmnop	2.4	10	B-10	<i>Bacillus</i>	42	bcdefghi	8.4
29	B-29	<i>Bacillus</i>	14	klmnop	2.8	1	B-1	<i>Bacillus</i>	47	bcdefgh	9.4
35	P-35	<i>Pseudomonas</i>	15	jklmnop	3	12	B-12	<i>Bacillus</i>	48	bcdfg	9.6
8	P-8	<i>Pseudomonas</i>	17	ijklmnop	3.4	9	P-9	<i>Pseudomonas</i>	50	cdetg	10
32	B-32	<i>Bacillus</i>	17	ijklmnop	3.4	19	P-19	<i>Pseudomonas</i>	50	bcdetg	10
60	B-60	<i>Bacillus</i>	17	ijklmnop	3.4	13	P-13	<i>Pseudomonas</i>	51	bcdef	10.2
58	P-58	<i>Pseudomonas</i>	18	ijklmnop	3.6	16	P-16	<i>Pseudomonas</i>	53	bcde	10.6
21	B-21	<i>Bacillus</i>	20	ijklmnop	4	11	B-11	<i>Bacillus</i>	57	bcd	11.4
27	B-27	<i>Bacillus</i>	20	ijklmnop	4	4	B-4	<i>Bacillus</i>	59	bc	11.8
31	B-31	<i>Bacillus</i>	20	ijklmnop	4	15	P-15	<i>Pseudomonas</i>	60	bc	12
43	B-43	<i>Bacillus</i>	20	jklmnop	4	3	B-3	<i>Bacillus</i>	63	b	12.6
49	P-49	<i>Pseudomonas</i>	20	ijklmnop	4	18	B-18	<i>Bacillus</i>	63	b	12.6
23	B-23	<i>Bacillus</i>	21	ijklmnop	4.2		Testigo	<i>Sin bacteria</i>	63	b	12.6
34	B-34	<i>Bacillus</i>	21	ijklmnop	4.2	38	B-38	<i>Bacillus</i>	64	a	20.8
39	B-39	<i>Bacillus</i>	21	ijklmnop	4.2						

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

Los resultados de la prueba de penetración indican que existieron diferencias significativas entre las bacterias endofíticas y el testigo (sin bacteria) sobre la penetración de *R. similis* en el sistema radical de las plantas.

De las 64 bacterias evaluadas 24 aislamientos presentaron porcentajes de penetración inferiores a 4%, en comparación al testigo que obtuvo un porcentaje de penetración de 12.6%.

Por otra parte, solamente el aislado, B-38 perteneciente al género *Bacillus* presentó porcentajes de penetración superiores al testigo (Cuadro 5). Dentro de los aislamientos que presentaron menores porcentajes de penetración se encuentran los tratamientos B-56, P-46, P-52, B-62, P-64. Sin embargo, 50 aislamientos de las 64 evaluados presentaron diferencias significativas con respecto al testigo, correspondiendo a porcentajes de penetración inferiores al 8%.

En el cuadro 6, se presentan los resultados de la prueba de colonización de las 64 bacterias evaluadas en la presente investigación. En general, la mayoría de las bacterias fueron muy eficientes en colonizar raíces, cormo, pseudotallo y hojas de la planta. Sin embargo, los mayores porcentajes de colonización se encontraron en las raíces y los cormos y en menor grado en las hojas. Considerando porcentajes de colonización promedio por planta independientemente del órgano colonizado, se encontró que 6 aislamientos presentaron porcentajes de colonización superiores a 90%, 18 aislamientos entre 80 a 90%, 19 aislamientos entre 70 a 80% y 18 aislamientos entre 60 a 70%. Solamente 4 aislamientos presentaron porcentajes de colonización menores de 60%.

Cuadro 6: Porcentaje de colonización de bacterias endofíticas en los órganos de plantas del cultivar Gran Enano.

Tratamiento	Código	Género	% de Colonización				Promedio por planta
			Raíz	Cormo	Tallo	Hoja	
64	P-64	<i>Pseudomonas</i>	90	100	100	100	97.5
62	B-62	<i>Bacillus</i>	80	100	100	100	95
28	B-28	<i>Bacillus</i>	90	100	100	90	95
30	B-30	<i>Bacillus</i>	80	100	100	90	92.5
61	B-61	<i>Bacillus</i>	60	100	100	100	90
13	P-13	<i>Pseudomonas</i>	70	100	100	90	90
26	B-26	<i>Bacillus</i>	70	100	100	80	87.5
60	B-60	<i>Bacillus</i>	80	100	90	80	87.5
49	P-49	<i>Pseudomonas</i>	100	90	80	80	87.5
53	B-53	<i>Bacillus</i>	90	100	100	60	87.5
12	B-12	<i>Bacillus</i>	80	90	100	80	87.5
52	P-52	<i>Pseudomonas</i>	70	100	90	70	82.5
59	P-59	<i>Pseudomonas</i>	80	100	100	50	82.5
29	B-29	<i>Bacillus</i>	70	100	90	70	82.5
8	P-8	<i>Pseudomonas</i>	90	90	100	60	82.5
32	B-32	<i>Bacillus</i>	50	90	100	90	82.5
16	P-16	<i>Pseudomonas</i>	80	90	100	60	82.5
14	B-14	<i>Bacillus</i>	50	90	100	90	82.5
46	P-46	<i>Pseudomonas</i>	60	100	100	60	80
37	B-37	<i>Bacillus</i>	50	90	100	80	80
40	B-40	<i>Bacillus</i>	60	100	90	70	80
35	P-35	<i>Pseudomonas</i>	50	90	100	80	80
43	B-43	<i>Bacillus</i>	50	80	100	90	80
39	B-39	<i>Bacillus</i>	40	100	80	100	80
63	P-63	<i>Pseudomonas</i>	70	100	90	50	77.5
48	P-48	<i>Pseudomonas</i>	40	100	100	70	77.5
58	P-58	<i>Pseudomonas</i>	50	100	100	60	77.5
31	B-31	<i>Bacillus</i>	50	100	100	60	77.5
57	P-57	<i>Pseudomonas</i>	90	100	90	30	77.5
38	B-38	<i>Bacillus</i>	38	100	100	80	77.5
55	P-55	<i>Pseudomonas</i>	60	100	100	40	75
36	B-36	<i>Bacillus</i>	60	100	100	40	75
27	B-27	<i>Bacillus</i>	30	90	100	80	75
34	B-34	<i>Bacillus</i>	50	90	100	60	75
6	P-6	<i>Pseudomonas</i>	70	100	100	30	75
4	B-4	<i>Bacillus</i>	50	100	90	70	75
47	B-47	<i>Bacillus</i>	100	80	80	30	72.5
3	B-3	<i>Bacillus</i>	60	90	100	70	72.5
44	P-44	<i>Pseudomonas</i>	80	100	60	40	70
23	B-23	<i>Bacillus</i>	30	90	90	70	70
2	B-2	<i>Bacillus</i>	60	70	90	60	70
15	P-15	<i>Pseudomonas</i>	60	70	100	50	70
9	P-9	<i>Pseudomonas</i>	80	70	90	40	70
18	B-18	<i>Bacillus</i>	30	50	100	90	67.5
24	B-24	<i>Bacillus</i>	60	70	90	50	67.5
20	B-20	<i>Bacillus</i>	80	80	90	20	67.5
11	B-11	<i>Bacillus</i>	40	90	100	40	67.5
1	B-1	<i>Bacillus</i>	40	90	90	50	67.5
33	B-33	<i>Bacillus</i>	50	100	100	20	67.5
10	B-10	<i>Bacillus</i>	60	80	90	50	67.5
7	B-7	<i>Bacillus</i>	70	90	70	40	67.5
5	B-5	<i>Bacillus</i>	70	80	90	20	65
25	B-25	<i>Bacillus</i>	50	80	90	40	65
56	B-56	<i>Bacillus</i>	20	90	90	80	62.5
45	P-45	<i>Pseudomonas</i>	40	50	80	80	62.5
50	B-50	<i>Bacillus</i>	30	80	90	50	62.5
54	P-54	<i>Pseudomonas</i>	40	100	70	40	62.5
17	P-17	<i>Pseudomonas</i>	30	90	100	30	62.5
41	B-41	<i>Bacillus</i>	30	80	90	50	62.5
21	B-21	<i>Bacillus</i>	50	60	80	50	60
51	B-51	<i>Bacillus</i>	30	80	70	60	60
42	B-42	<i>Bacillus</i>	20	100	90	20	57.5
22	B-22	<i>Bacillus</i>	30	60	60	50	50
19	P-19	<i>Pseudomonas</i>	20	80	70	30	50
	Testigo	Sin bacteria	60	60	60	20	50

Cuadro 7 Selección de las mejores 30 bacterias endofíticas basado en la reducción de la penetración y habilidad de colonización de las plantas

Tratamiento	Código	Género	Finca	% de colonización	% de penetración
10	B-56	<i>Bacillus sp.</i>	Duacari 2	62.5	0
12	B-62	<i>Bacillus sp.</i>	Duacari 2A	95	0.6
16	P-52	<i>Pseudomona</i>	Duacari 2	82.5	0.6
23	P-64	<i>Pseudomona</i>	Duacari 2 <sup>a</sup>	97.5	0.6
30	P-46	<i>Pseudomona</i>	Frutera A	80	0.6
21	P-59	<i>Pseudomona</i>	Duacari 2	82.5	1
25	P-45	<i>Pseudomona</i>	Frutera A	62.5	1
18	P-55	<i>Pseudomona</i>	Duacari 2	75	1.2
22	P-63	<i>Pseudomona</i>	Duacari 2 <sup>a</sup>	77.5	1.2
11	B-61	<i>Bacillus sp.</i>	Duacari 2A	90	1.6
26	P-48	<i>Pseudomona</i>	Frutera A	77.5	1.6
27	P-54	<i>Pseudomona</i>	Duacari 2	77.5	1.6
4	B-28	<i>Bacillus sp.</i>	Monte Libano	95	1.8
7	B-37	<i>Bacillus sp.</i>	El Carmen 1	80	1.8
9	B-50	<i>Bacillus sp.</i>	Frutera A	62.5	1.8
24	P-44	<i>Pseudomona</i>	Frutera A	70	1.8
6	B-36	<i>Bacillus sp.</i>	El Carmen 1	75	2.4
5	B-29	<i>Bacillus sp.</i>	Monte Libano	82.5	2.8
28	P-8	<i>Pseudomona</i>	El Carmen 2A	82.5	3.4
20	P-58	<i>Pseudomona</i>	Duacari 2	77.5	3.6
3	B-31	<i>Bacillus sp.</i>	El Carmen 1	77.5	4
8	B-43	<i>Bacillus sp.</i>	Frutera	80	4
14	B-21	<i>Bacillus sp.</i>	Monte Libano	60	4
17	P-49	<i>Pseudomona</i>	Frutera A	87.5	4
15	B-23	<i>Bacillus sp.</i>	Monte Libano	70	4.2
19	P-57	<i>Pseudomona</i>	Duacari 2	77.5	4.2
2	B-25	<i>Bacillus sp.</i>	Monte Libano	65	4.8
13	B-14	<i>Bacillus sp.</i>	El Imperio	82.5	5.2
29	P-17	<i>Pseudomona</i>	El Imperio	62.5	5.8
1	B-7	<i>Bacillus sp.</i>	El Carmen 2	67.5	6

El cuadro 7 contiene las 30 bacterias endofíticas seleccionadas tomando en consideración su efecto sobre la penetración del nematodo y su habilidad para colonizar los órganos de la planta. Las bacterias seleccionadas presentaron porcentajes de penetración de *R. similis* en el sistema radical inferiores al 6% y colonizaciones superiores al 62%. Dando prioridad al porcentaje de penetración debido a que es una variable más robusta e indicadora del potencial antagonista de las bacterias sobre el nematodo en cuestión. De las 30 bacterias seleccionadas 16 presentaron porcentajes de penetración menores al 2%, correspondiendo a 10 aislamientos del género *Pseudomonas* y 6 aislamientos del género *Bacillus*. Ocho aislamientos presentaron porcentajes de penetración entre 2 a 4% (Cuadro 7).

### **6.5 Efecto de los aislamientos endofíticos en la actividad de biocontrol contra *Radopholus similis* en vitroplantas de banano**

La actividad de biocontrol de los 30 aislamientos de bacterias endofíticas fue evaluada en dos cultivares de banano: **Williams y Gran Enano**. Para el cultivar Williams, existieron diferencias significativas en la población final de *R. similis* en el sistema radical en comparación con el testigo con nematodos, pero no con el testigo químico. Sin embargo, 15 de las bacterias evaluadas presentan actividad antagonista similar estadísticamente que el control químico, correspondiendo a porcentajes de biocontrol entre 73 a 96% (Cuadro 8). Es importante destacar que el aislamiento P 52 perteneciente al género *Pseudomonas* presentó porcentajes de biocontrol superiores al químico 96 y 95% respectivamente. Adicionalmente, 6 bacterias tuvieron porcentajes de biocontrol superior o igual al 90%, cuatro aislamientos con biocontrol entre el 80 y 90%, y cinco aislamientos con actividad de biocontrol entre 70 y 80%. De las mejores bacterias biocontroladoras se encuentran los aislamientos: P-52, B-31, P-58, B-23, B-36, B-44 y por otra parte solamente un aislamiento perteneciente al género *Pseudomonas* presentó una población final de *R. similis* superior al testigo.

Cuadro 8: Efecto de 30 bacterias endofíticas sobre el control de *Radopholus similis* en el cultivar Williams, después de 6 semanas de la inoculación de nematodos

Trata.	Código	Género	Peso aéreo	Peso Raíz	Nemátodos Totales	% de Biocontrol
16	P-52	<i>Pseudomona</i>	13.94 ab	5.48 abc	25 m	96
31	Q	Químico	10.78 abc	5.60 abc	30 lm	95
3	B-31	<i>Bacillus</i>	9.80 abc	8.76 a	30 lm	95
20	P-58	<i>Pseudomona</i>	11.06 abc	5.60 abc	45 klm	94
15	B-23	<i>Bacillus</i>	10.22 abc	8.14 ab	75 jklm	90
6	B-36	<i>Bacillus</i>	11.00 abc	6.60 abc	75 jklm	90
8	B-43	<i>Bacillus</i>	9.98 abc	6.48 abc	75 jklm	90
14	B-21	<i>Bacillus</i>	9.28 abc	6.74 abc	95 jklm	87
9	B-50	<i>Bacillus</i>	9.58 abc	4.30 bc	115 ijklm	84
7	B-37	<i>Bacillus</i>	7.50 c	3.92 c	130 hijklm	83
11	B-61	<i>Bacillus</i>	9.72 abc	6.70 abc	145 ghijklm	81
28	P-8	<i>Pseudomona</i>	10.46 abc	4.94 abc	165 ghijklm	78
12	B-62	<i>Bacillus</i>	8.98 abc	5.92 abc	165 ghijklm	78
5	B-29	<i>Bacillus</i>	11.68 abc	6.48 abc	175 ghijklm	77
1	B-7	<i>Bacillus</i>	9.40 abc	5.12 abc	205 fghijklm	73
4	B-28	<i>Bacillus</i>	10.24 abc	7.14 abc	205 fghijklm	73
10	B-56	<i>Bacillus</i>	8.76 abc	5.98 abc	225 fghijkl	70
30	P-46	<i>Pseudomona</i>	12.06 abc	6.92 abc	225 fghijkl	70
2	B-25	<i>Bacillus</i>	12.18 abc	7.36 abc	235 fghijk	69
17	P-49	<i>Pseudomona</i>	11.20 abc	8.46 a	245 fghij	67
27	P-54	<i>Pseudomona</i>	11.22 abc	7.14 abc	305 efghi	60
19	P-57	<i>Pseudomona</i>	13.68 ab	8.06 ab	310 efgh	59
29	P-17	<i>Pseudomona</i>	11.22 abc	5.82 abc	320 defgh	58
25	P-45	<i>Pseudomona</i>	12.58 abc	7.58 abc	330 defg	56
21	P-59	<i>Pseudomona</i>	11.80 abc	7.30 abc	370 def	51
18	P-55	<i>Pseudomona</i>	12.34 abc	8.18 ab	435 cde	43
24	P-44	<i>Pseudomona</i>	11.70 abc	6.94 abc	435 cde	43
23	P-64	<i>Pseudomona</i>	10.92 abc	5.26 abc	500 bcd	34
22	P-63	<i>Pseudomona</i>	14.44 a	5.18 abc	550 bc	28
13	B-14	<i>Bacillus</i>	8.36 bc	4.96 abc	590 bc	22
33	SinNem	Testigo	10.90 abc	6.62 abc	660 ab	13
26	P-48	<i>Pseudomona</i>	10.80 abc	7.26 abc	765 a	0

### Variedad Gran Enano

La actividad de biocontrol de los 30 aislamientos de bacterias endofíticas en la variedad Gran Enano registró una tendencia de biocontrol similar que en la variedad Williams. Veinte (20) de las 30 bacterias evaluadas tuvieron un comportamiento de biocontrol igual estadísticamente que el testigo químico (Cuadro 9). Encontrándose que 7 bacterias presentaron porcentajes de biocontrol entre 80 a 85%, 4 bacterias entre 70 a 80%, y 6 bacterias entre 60 a 70%. Dentro de las bacterias prospecto para el biocontrol de *R. similis* se destaca el grupo de las *Pseudomonas* representado por: P-8, P-44, P-48, P-58, P-54, P-46 y dentro del grupo *Bacillus*: B-14, B-21, B-50 y la B-61. Sin embargo, el mejor biocontrol se

obtuvo con el tratamiento químico correspondiendo a un 93% de reducción en la población final de *R. similis* en el sistema radical.

Cuadro 9. Efecto de 30 bacterias endofíticas sobre el control de *Radopholus similis* en el cultivar Gran Enano, después de seis semanas de la inoculación con nematodos.

Trata.	Código	Género	Peso aéreo	Peso Raíz	Total nemátodos	%Biocontrol			
31	Q	Químico	12 08	ab	11 9	i	125	i	93
28	P-8	<i>Pseudomona</i>	8 80	a	2 18	abc	285	hi	85
24	P-44	<i>Pseudomona</i>	8 13	a	2 4	abc	300	hi	85
25	P-45	<i>Pseudomona</i>	7 30	a	3	abcdef	340	hi	83
20	P-58	<i>Pseudomona</i>	7 22	a	2 34	ab	340	hi	83
27	P-54	<i>Pseudomona</i>	10 08	a	2 5	abc	350	hi	82
30	P-46	<i>Pseudomona</i>	1 78	a	1 78	a	380	hi	80
13	B-14	<i>Bacillus</i>	13 88	ab	5	bcdefgh	390	hi	80
18	P-55	<i>Pseudomona</i>	12 48	ab	6 44	bcdefgh	420	hi	78
29	P-17	<i>Pseudomona</i>	10 26	a	2 64	abcde	440	ghi	77
23	P-64	<i>Pseudomona</i>	10 26	a	4 54	abcdefg	510	fghi	73
14	B-21	<i>Bacillus</i>	15 20	ab	6 7	efghi	545	fghi	72
16	P-52	<i>Pseudomona</i>	13 45	ab	9 93	hi	605	fghi	69
9	B-50	<i>Bacillus</i>	8 76	a	4 66	abcdefg	615	fghj	68
11	B-61	<i>Bacillus</i>	15 22	ab	6 24	defghi	625	fghi	68
7	B-37	<i>Bacillus</i>	12 06	ab	5 8	abcdefgh	625	fghi	68
3	B-31	<i>Bacillus</i>	10 90	a	5 58	abcdefgh	665	fghi	66
22	P-63	<i>Pseudomona</i>	12 52	ab	5 24	abcdefgh	755	efghi	61
15	B-23	<i>Bacillus</i>	39 40	b	7 16	fghi	805	efghi	59
19	P-57	<i>Pseudomona</i>	11 44	a	4 24	abcdefg	845	cdefghi	56
12	B-62	<i>Bacillus</i>	14 34	ab	5 42	abcdefgh	855	cdefghi	56
21	P-59	<i>Pseudomona</i>	10 82	a	4 4	abcdefg	945	cdefgh	51
8	B-43	<i>Bacillus</i>	13 76	ab	6 2	cdefghi	1050	cdefgh	46
26	P-48	<i>Pseudomona</i>	10 90	a	3 35	abcdef	1180	bcdefg	39
6	B-36	<i>Bacillus</i>	12 04	ab	4 42	abcdefg	1210	bcdef	38
2	B-25	<i>Bacillus</i>	10 76	a	6 08	defghi	1415	abcde	27
17	P-49	<i>Pseudomona</i>	15 18	ab	10 34	hi	1475	abcde	24
4	B-28	<i>Bacillus</i>	11 36	a	2 42	bcdefghi	1515	abcd	22
5	B-29	<i>Bacillus</i>	13 58	ab	6 34	defghi	1565	abc	19
1	B-7	<i>Bacillus</i>	13 58	ab	6 12	bcdefghi	1815	ab	6.9
10	B-56	<i>Bacillus</i>	12 62	ab	3 82	abcdef	1850	ab	5.1
33	SinNem.	testigo	7.90	a	5.04	abcdefgh	1950	a	0



El cuadro 10, resume las mejores bacterias endofíticas que presentaron mejor actividad de biocontrol de *R. similis* en las dos variedades de banano evaluadas: Gran Enano y Williams, y que no presentaron diferencias significativas con el testigo químico. En general, tanto el grupo de las *Pseudomonas* como el grupo de *Bacillus* presentan bacterias prospecto para el biocontrol de *R. similis*. Sobresaliendo los aislamientos P-52, P-58, correspondiente 83% y 94% biocontrol en la variedad Williams y 69% y 83% de biocontrol en la variedad Gran Enano. Por otra parte para los géneros *Bacillus* sobresalieron los B-21 y B-50, correspondiente a 87% y 84% en la variedad Williams y 72% y 68% de biocontrol en la variedad Gran Enano.

Cuadro 10. Efecto de las mejores 10 bacterias sobre el control de *Radopholus similis*, en las variedades Gran Enano y Williams

Gran Enano			Williams		
Código	Género	% de Biocontrol	Código	Género	% de Biocontrol
Q	Químico	93	P-52	<i>Pseudomona</i>	96
P-8	<i>Pseudomona</i>	85	Q	Químico	95
P-58	<i>Pseudomona</i>	83	B-31	<i>Bacillus</i>	96
B-21	<i>Bacillus</i>	72	P-58	<i>Pseudomona</i>	94
P-52	<i>Pseudomona</i>	69	B-23	<i>Bacillus</i>	90
B-50	<i>Bacillus</i>	68	B-21	<i>Bacillus</i>	87
B-61	<i>Bacillus</i>	68	B-50	<i>Bacillus</i>	84
B-37	<i>Bacillus</i>	68	B-37	<i>Bacillus</i>	83
B-31	<i>Bacillus</i>	66	B-61	<i>Bacillus</i>	81
B-23	<i>Bacillus</i>	59	P-8	<i>Pseudomona</i>	78
B-62	<i>Bacillus</i>	56	B-62	<i>Bacillus</i>	78

## 6.6. Promoción de Crecimiento y cambios en la morfología de las raíces de las plantas

### Variedad Williams

Para la variable de peso radical los resultados indican que hubo diferencias significativas entre los tratamientos evaluados. Veinte y dos (22) de los aislamientos de bacterias endofíticas evaluados no fueron estadísticamente diferentes del testigo. Sin embargo, 4

aislamientos del género *Bacillus* que presentaron actividad de biocontrol en las dos variedades de banano evaluadas: B-31, B-62, B-50, B-61 presentaron mayor peso radical que el testigo, solo nematodos (Cuadro 11). Estos datos sugieren que la actividad de promoción de crecimiento radical esta mas asociada al grupo de *Bacillus* que al grupo de las *Pseudomonas*. Para la variable de peso foliar no se registraron diferencias significativas entre los aislamientos de bacterias y el testigo. Los valores de peso foliar oscilaron entre 8.82 a 12.76 gramos.

Para las variables de promoción de crecimiento medidas con el programa WinRhizo, se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos, sin embargo un alto porcentaje de las bacterias evaluadas presentaron similar comportamiento que el testigo (sin bacteria). Por ejemplo, para la variable de longitud radical, 23 de las bacterias evaluadas presentaron comportamiento estadísticamente similar que el testigo (sin bacteria). Los valores de longitud radical oscilaron entre 963 a 1163.7 centímetros. De igual forma para la variable diámetro radical 16 bacterias tuvieron comportamiento similar al testigo (sin bacteria) y los valores oscilaron entre 1.07 a 1.27 milímetros. Finalmente para la variable volumen radical 20 de las 30 bacterias evaluadas tuvieron comportamiento similar al testigo (sin bacteria) y los valores oscilaron entre 9.15 a 12.70 cm<sup>3</sup>.

Cuadro 11 Efecto de las 30 bacterias endofíticas sobre la promoción de crecimiento en la variedad Williams, después de ocho semanas de crecimiento

Código	Género	Longitud	Diámetro		Volumen		Peso foliar	Peso de raíz		Peso Total		
Testigo	Sin bacteria	1163.70	abc	1.18	abc	12.70	abc	12.76	a	7.98	abcd 20.74	a
B-61	<i>Bacillus</i>	1139.10	abc	1.20	ab	12.93	ab	11.50	a	8.94	a 20.44	ab
B-7	<i>Bacillus</i>	1116.10	abc	1.12	abcd	11.02	abad	11.76	a	8.38	ab 20.14	ab
P-55	<i>Pseudomona</i>	1107.00	abc	1.14	abcd	11.38	abad	12.70	a	7.30	abcd 20.00	ab
B-43	<i>Bacillus</i>	1301.90	abc	1.04	bcdef	10.94	abad	11.94	a	7.96	abcd 19.90	abc
P-8	<i>Pseudomona</i>	1107.00	abc	1.14	abcd	11.38	abad	12.34	a	7.30	abcd 19.64	abcde
B-31	<i>Bacillus</i>	1401.40	ab	1.07	abcdef	12.56	abc	11.24	a	8.34	abc 19.58	abcd
B-62	<i>Bacillus</i>	1316.60	abc	1.11	abcd	12.77	abc	10.60	a	8.84	a 19.44	abcd
B-50	<i>Bacillus</i>	1132.80	abc	1.27	a	14.53	a	10.46	a	8.84	a 19.29	abcd
P-46	<i>Pseudomona</i>	1557.20	a	0.89	f	9.69	abad	11.62	a	7.16	abcd 18.78	abcdef
P-57	<i>Pseudomona</i>	1176.40	abc	1.04	bcdef	9.53	abad	12.26	a	6.18	abcd 18.44	abcdef
B-25	<i>Bacillus</i>	1141.90	abc	1.06	bcdef	10.16	abad	10.82	a	7.04	abcd 17.86	abcdefg
P-63	<i>Pseudomona</i>	1115.40	abc	1.09	abcde	10.61	abad	11.50	a	6.34	abcd 17.84	abcdefg
B-21	<i>Bacillus</i>	1146.10	abc	1.12	abcd	11.22	abad	11.70	a	6.06	abcd 17.76	abcdefg
B-29	<i>Bacillus</i>	1294.50	abc	1.06	bcdef	11.33	abad	10.84	a	6.90	abcd 17.74	abcdefg
B-14	<i>Bacillus</i>	921.01	bc	1.13	abcd	9.18	abad	10.98	a	6.60	abcd 17.58	abcdefg
P-52	<i>Pseudomona</i>	963.72	abc	1.10	abcd	8.98	bcd	12.16	a	5.38	abcd 17.54	abcdefg
B-56	<i>Bacillus</i>	1050.20	abc	1.14	abcd	10.74	abad	10.28	a	6.88	abcd 17.16	abcdefg
B-37	<i>Bacillus</i>	1060.50	abc	1.08	abcdef	9.48	abad	10.10	a	6.62	abcd 16.72	abcdefg
P-49	<i>Pseudomona</i>	794.00	bc	1.15	abcd	8.27	bcd	11.12	a	5.54	abcd 16.66	abcdefg
P-45	<i>Pseudomona</i>	818.66	bc	1.02	bcdef	6.50	d	11.94	a	4.42	d 16.36	abcdefg
B-36	<i>Bacillus</i>	953.28	abc	1.06	bcdef	8.45	bcd	10.50	a	5.32	abcd 15.82	abcdefg
P-54	<i>Pseudomona</i>	897.43	bc	0.99	cdef	6.91	d	11.24	a	4.54	cd 15.78	abcdefg
P-59	<i>Pseudomona</i>	1099.80	abc	1.04	bcdef	9.15	abad	10.12	a	5.86	abcd 15.48	abcdefg
B-23	<i>Bacillus</i>	1002.00	abc	1.07	bcdef	9.00	bcd	10.58	a	4.72	bcd 15.30	abcdefg
P-17	<i>Pseudomona</i>	1247.30	abc	0.89	ef	7.84	bcd	10.16	a	4.86	bcd 15.02	bcdefg
P-44	<i>Pseudomona</i>	916.65	bc	1.03	bcdef	1.03	bcdef	9.86	a	5.00	bcd 14.86	defg
B-28	<i>Bacillus</i>	1280.60	abc	0.96	def	9.17	abad	9.38	a	5.32	abcd 14.70	defg
P-64	<i>Pseudomona</i>	783.14	c	1.06	bcdef	6.44	d	9.88	a	4.26	d 14.14	efg
P-58	<i>Pseudomona</i>	783.14	c	1.11	abcd	7.47	cd	8.82	a	4.42	d 13.20	fg
P-48	<i>Pseudomona</i>	837.64	bc	1.05	bcdef	7.09	d	8.82	a	4.26	d 13.07	g

Letras distintas difieren significativamente ( $p < 0.05$ )

## Gran Enano

Para la variable de peso radical los resultados indican que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos evaluados, todos los aislamientos se comportaron de manera similar al testigo, sin embargo cuatro aislamientos presentaron mayor peso que el testigo, entre ellos la B-31, que presentó también actividad de biocontrol en las dos variedades de banano. Para la variable peso foliar del grupo de las *Bacillus* la B-21 presentó un peso foliar de 17.48 gramos siendo estadísticamente diferente a la testigo.

En promoción de crecimiento, los resultados evaluados por el programa WinRhizo, en la variable longitud, la B-31 presentó una longitud de 1139.3 centímetros estadísticamente diferente a la testigo, además 4 de los aislamientos superan a la testigo: P-48, B-43, B-50, B-37, los dos últimos con actividad de biocontrol. Para diámetro todos los tratamientos tuvieron

comportamiento similar al testigo y los valores oscilaron entre 1.2963 a 0.959 milímetros. Al igual para la variable volumen todos los tratamientos se comportan de manera similar a la testigo y los valores oscilan entre 8.178cm a 3.987 cm. (Cuadro12).

*Cuadro 12. Efecto de 30 bacterias endofíticas sobre la promoción de crecimiento de plantas del cultivar Gran Enano, después de ocho semanas de crecimiento*

Trata.	Código	Género	Longitud		Diámetro		Volumen		Peso foliar		Peso de raíz	
14	B-21	<i>Bacillus</i>	361.7	de	1.48	abc	6.22	abcd	17.48	a	4.78	ab
17	P-49	<i>Pseudomona</i>	375.1	de	1.39	abad	5.60	abcd	16.54	ab	4.5	ab
18	P-55	<i>Pseudomona</i>	374.9	de	1.47	abc	6.40	abcd	15.76	abc	5.06	ab
19	P-57	<i>Pseudomona</i>	521.2	de	1.32	abad	6.87	abcd	15.32	abad	5.38	ab
13	B-14	<i>Bacillus</i>	294.1	e	1.62	a	5.9	abcd	15.90	abc	4.62	ab
22	P-63	<i>Pseudomona</i>	580.2	cde	1.31	abcde	7.49	abc	13.30	abad	6.24	a
10	B-56	<i>Bacillus</i>	545.3	cde	1.25	abcde	5.61	abcd	14.22	abad	4.6	ab
15	B-23	<i>Bacillus</i>	301	e	1.48	abc	5.08	abcd	14.70	abad	4.04	ab
4	B-28	<i>Bacillus</i>	448.6	de	1.24	abcde	5.45	abcd	14.32	abad	4.36	ab
12	B-62	<i>Bacillus</i>	247.3	e	1.40	abc	3.98	cd	15.02	abad	3.08	ab
11	B-61	<i>Bacillus</i>	239.3	e	1.55	ab	4.40	cd	14.56	abad	3.5	ab
3	B-31	<i>Bacillus</i>	1139.3	a	0.93	e	7.96	ab	11.90	abad	6.14	ab
8	B-43	<i>Bacillus</i>	1039.8	ab	0.95	e	7.52	abc	11.98	abad	5.8	ab
7	B-37	<i>Bacillus</i>	783.1	abcd	0.99	de	5.98	abcd	12.16	abad	5.28	ab
25	P-45	<i>Pseudomona</i>	583.2	cde	1.14	cde	5.67	abcd	12.36	abad	4.62	ab
16	P-52	<i>Pseudomona</i>	340.5	de	1.37	abad	4.89	abcd	12.92	abad	3.6	ab
26	P-48	<i>Pseudomona</i>	615.7	bcde	1.23	abcde	7.13	abcd	12.92	abad	3.6	ab
9	B-50	<i>Bacillus</i>	983	abc	0.93	e	6.74	abcd	11.06	bcd	5.18	ab
5	B-29	<i>Bacillus</i>	498.4	de	1.31	abcde	5.50	abcd	12.18	abad	4	ab
31	Testigo	Sin bacteria	616.5	bcde	1.29	abcde	8.17	a	10.02	cd	5.58	ab
27	P-54	<i>Pseudomona</i>	434.5	de	1.27	abcde	5.41	abcd	9.72	d	5.8	ab
6	B-36	<i>Bacillus</i>	246.9	e	1.49	abc	4.26	cd	11.90	abad	3.22	ab
23	P-64	<i>Pseudomona</i>	350.6	de	1.41	abc	5.11	abcd	10.98	bcd	3.8	ab
28	P-8	<i>Pseudomona</i>	591.5	cde	1.12	cde	5.52	abcd	9.76	d	4.98	ab
21	P-59	<i>Pseudomona</i>	418.5	de	1.24	abcde	5.11	abcd	10.60	cd	3.82	ab
1	B-7	<i>Bacillus</i>	307.7	de	1.46	abc	4.93	abcd	10.80	bcd	3.42	ab
24	P-44	<i>Pseudomona</i>	426.1	de	1.22	abcde	4.80	bcd	10.60	cd	3.24	ab
30	P-46	<i>Pseudomona</i>	594.6	cde	1.12	cde	5.56	abcd	10.12	cd	3.68	ab
20	P.58	<i>Pseudomona</i>	266.3	e	1.40	abc	4.15	cd	10.76	bcd	2.96	b
29	P.17	<i>Pseudomona</i>	514.8	de	1.17	bcde	5.46	abcd	9.78	d	3.94	ab
2	B-25	<i>Bacillus</i>	381.5	de	1.21	abcde	4.37	cd	10.48	cd	3.18	ab

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1 Diversidad de bacterias endofíticas

En la presente investigación se recolectaron 242 aislamientos de bacterias endofíticas de los sitios de alta y baja producción de 12 fincas estudiadas. El género *Bacillus* fue el más frecuentemente aislado tanto en el sitio de alta y baja producción, registrándose un porcentaje promedio de 60 y 54% respectivamente. Por otra parte, independientemente del sitio de producción, en nueve de las doce fincas analizadas, los aislamientos de *Bacillus* fueron los más frecuentemente recobrados (Fig. 4). El segundo género más frecuentemente encontrado fue *Pseudomonas* spp encontrándose 14% en el sitio de alta producción y 17% en el sitio de baja producción. Sin embargo, este género no fue predominante en ninguna de las 12 fincas estudiadas. Estos resultados concuerdan con los encontrados por Faupel (2004), quien trabajando en papa recobró 2716 aislamientos de la rizosfera y los géneros más frecuentemente encontrados fueron *Pseudomonas* y *Bacillus*. Adicionalmente, Buchenauer (1998) realizó una extensiva revisión de literatura sobre rizobacterias asociadas a diferentes cultivos y concluye que los géneros de *Bacillus* y *Pseudomonas* son habitantes naturales de la rizosfera y son muy frecuentemente encontrados en la mayoría de las plantas superiores. Por otra parte, está completamente demostrado que tanto *Bacillus* como *Pseudomonas* pueden establecer relaciones simbióticas con otros microorganismos de la rizosfera como micorrizas (Lindermann 1992).

El género *Bacillus* ha sido documentado como un habitante natural de los suelos agrícolas a nivel mundial y en muchos patosistemas ha mostrado cierta capacidad de suprimir algunos patógenos del suelo (McSpadden y Beuerlin 2004). En la actualidad se están realizando intensivos screening de poblaciones de cepas de *Bacillus* spp, así como evaluaciones de campo para seleccionar cepas de este género como agentes biológicos de control de patógenos del suelo y existen cepas comerciales registradas para su uso en la agricultura en Estados Unidos de América, por ejemplo la cepa *Bacillus subtilis* GB 03 y QST713 (McSpadden 2004). De igual forma, cepas de *Pseudomonas* han sido ampliamente documentadas como agentes biológicos de control de patógenos del suelo (Arndt y Buchenauer 1998, Buchenauer 1998). Los resultados de la presente investigación evidencian que tanto *Bacillus* como *Pseudomonas* son los géneros más frecuentemente aislados de los

tejidos internos de las raíces de banano y que existe una gran probabilidad de encontrar agentes biológicos de control para nematodos por lo cual es necesario realizar bioensayos de selección para identificar y seleccionar las cepas con actividad antagonista.

Los resultados obtenidos en la prueba de penetración en el cultivar Gran Enano, demostraron que 24 aislamientos de bacterias endofíticas presentaron porcentajes de penetración inferiores a 4% y fueron estadísticamente distintos del testigo sin inoculación con bacteria que obtuvo un 12.6% de penetración. Entre los mejores prospectos como agentes reductores de la penetración se destacan para *Bacillus* los aislamientos B-56, B-62, B-61, B-28 y B-37. De igual manera para el género *Pseudomonas* se destacaron los aislamientos P-46, P-52, P-64, P-45 y P-59 (Cuadro 5). Resultados similares fueron encontrados por Zum Felde *et al* 2006, quienes encontraron que aislamientos endofíticos del género *Trichoderma* y cepas no patogénicas de *Fusarium oxysporum* redujeron significativamente la penetración de *R similis* en plantas del cultivar Valery nueve días después de la inoculación. El efecto de hongos endofíticos sobre la penetración está relacionado con un proceso de repelencia que evita que el nematodo pueda intersectar el sistema radical y posteriormente penetrar al interior de las raíces. Los mismos autores consideran que el efecto de repelencia sobre la penetración es método de biocontrol más plausible que el biocontrol que se de al interior de los tejidos de las raíces (Zum Felde *et al.* 2006, por publicar).

De igual manera, en otros cultivos se ha demostrado la acción de aislamientos de *Bacillus* sobre la penetración y agallamiento causado por *Meloidogyne*. Por ejemplo, Jonathan *et al.* (2000) encontró que con la aplicación de bacterias (*Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *B. sphaericus*, *Agrobacterium radiobacter*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. chlororaphis* y *Burkholderia cepacia*) suprimieron la penetración y el desarrollo de agalla de raíces en tomate, así como limitaron la reproducción de *Meloidogyne incógnita* dentro del sistema radical.

Está completamente establecido que aislamientos de *Pseudomonas* spp y *Bacillus* spp son capaces de producir compuestos volátiles tóxicos para patógenos del suelo, principalmente ácido cianhídrico (Buchenauer 1998). Asimismo, se ha documentado que varios aislamientos de *P. fluorescens* producen antibióticos que pueden afectar a patógenos del suelo (Howell *et al.* 1980). Probablemente entre los mecanismos de acción que pueden estar involucrados en

la repelencia de la penetración de los nematodos en el sistema radical se encuentra la producción de sustancias volátiles y metabolitos secundarios que son tóxicos a *R. similis*, lo cual interfiere o evita la penetración. Sin embargo, en la actualidad se desconoce qué compuestos están relacionados con esta repelencia a la penetración y estudios tendientes a dilucidar este fenómeno son necesarios.

Los resultados de las pruebas de colonización demostraron que la mayoría de los aislamientos de bacterias endofíticas tuvieron la capacidad de colonizar todos los órganos de la planta analizados: raíces, cormos, pseudotallo y hojas. Esta capacidad de colonización vertical en toda la planta evidencia el comportamiento endofítico de las bacterias. Los mayores porcentajes de colonización se presentaron en las raíces y cormos y en menor grado en pseudotallo y hojas. Tanto el grupo de *Pseudomonas* como *Bacillus* presentaron porcentajes de colonización superiores al 90%, destacándose los aislamientos P-64 y P-13 y para el grupo *Bacillus*, B-62, B-28, B-30 y B-61. El proceso de colonización de las raíces por parte de *Pseudomonas* y *Bacillus* ha sido bien estudiado por autores (Weller 1983, Loper *et al.* 1985, Liftchitz *et al.* 1987). Estos autores coinciden en que el proceso de colonización tiene varios pasos, comenzando con la adhesión de las esporas de las bacterias a los sitios apropiados de las raíces, seguido por la multiplicación de la bacteria a lo largo del sistema radical para competir con otros microrganismos nativos por nutrientes y sitios de penetración. Una vez la bacteria penetra al interior del sistema radical tiene la ventaja de no tener mucha competencia y puede reproducirse con mayor facilidad. En esta investigación la alta habilidad de colonización de *Bacillus* y *Pseudomonas*, posiblemente se debe a que ambos géneros fueron aislados creciendo endofíticamente en los tejidos internos de las raíces de banano y la condición de ser endofíticas, les confiere esta alta habilidad de crecer más rápidamente y poder ser más agresivas que otras bacterias nativas del suelo.

Está completamente comprobado que la actividad antagonista de un agente biológico de control de *R. similis* está relacionado primeramente con su capacidad de reducir la penetración del nematodo (Pocasangre 2000 y Zum Felde *et al.* 2006). Por otro lado, una condición básica de un agente biológico de control es que colonice la patozona que es el lugar donde el nematodo encuentra sus sitios parasíticos para poder vivir y reproducirse. Consecuentemente, con base en los resultados obtenidos en las pruebas de penetración de *R.*

*similis* en el sistema radical, así como los porcentajes de colonización, se seleccionaron 30 aislamientos de bacterias endofíticas de las 65 evaluadas. En general, las bacterias seleccionadas presentaron altos porcentajes de colonización, superiores a 65%, y porcentajes de penetración inferiores a 6% (Cuadro 7). El efecto de este grupo de 30 bacterias fue evaluado en los bioensayos para medir la tasa de reproducción de *R. similis* y los bioensayos de promoción de crecimiento en ausencia del nematodo.

## **7.2 Bioensayo para medir el efecto de biocontrol las bacterias contra *Radopholus similis*.**

Los resultados de biocontrol medidos con la población final de *R. similis* en el sistema radical de vitroplantas de banano, de los dos cultivares, Gran Enano y Williams demostraron que las plantas protegidas con bacterias endofíticas presentaron una reducción significativa en la población final, respecto a las plantas control que no fueron inoculadas con bacterias. Asimismo, en el cultivar Williams 15 aislamientos de bacterias endofíticas presentaron comportamiento similar que el nematicida, y en el caso Gran Enano, 20 aislamientos (cuadros 8 y 9). Estos datos sugieren que la mayoría de las bacterias seleccionadas tienen alta actividad antagonista contra *R. similis* y que pueden ser consideradas como prospectos para el control de *R. similis*. Resultados similares fueron encontrados por Quesada (2006), quien trabajando con bacterias endofíticas en el cultivar Gran Enano encontró dos aislamientos del género *Bacillus* que redujeron la tasa de reproducción de *R. similis* hasta en un 87% y la actividad de biocontrol fue estadísticamente igual a la del nematicida Counter. Asimismo, la experiencia exitosa en Cuba del uso de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* cepa LBT-3 para el control biológico de nematodos en plátano y banano, encontrando que en condiciones experimentales en condiciones de campo, se observó una disminución de las poblaciones de *R. similis* con respecto a las poblaciones iniciales y al testigo. Experimentos de campo en 165 ha. promediaron un 87.02% de efectividad de biocontrol. Actualmente en la provincia de Camagüey, se han protegido un total de 6.789 hectáreas de plátano y banano con este nematicida biológico. Recientemente, también se ha evaluado la actividad antagonista de hongos endofíticos pertenecientes al género *Trichoderma* y cepas no patogénicas de *Fusarium oxysporum* en condiciones de campo encontrándose reducciones significativas en la población de *R. similis* en comparación con tres aplicaciones de nematicidas en fincas comerciales de banano en Costa Rica (Menjivar 2005, Pocasangre *et al.* 2006).



La actividad de biocontrol del género *Bacillus* también ha sido reportada para controlar nematodos endoparásitos sedentarios como *Meloidogyne incognita* en otros cultivos. Por ejemplo en tomate, Tehrhardt, (1998) encontró que aislamientos de *Bacillus thuringiensis* lograron reducir el número de agallas en plantas de tomate hasta en un 23%. De igual forma, la actividad bicontroladora de diferentes aislamientos de *Pseudomonas* spp. ha sido demostrada por Faupel (2004), quien trabajando con 157 aislamientos de *Pseudomonas* y *Streptomyces*, encontró que 47 aislamientos presentaron una alta actividad antagonista contra *Meloidogyne incognita* en papa, reduciendo el número de agallas en más de un 25%. Este amplio espectro de biocontrol de nematodos y patógenos del suelo hacen del género *Bacillus* la rizobacteria más robusta para el biocontrol de patógenos, lo cual se comprueba debido a que en la actualidad de las alternativas no químicas, cepas *Bacillus* spp. es la bacteria más usada mundialmente para el control de plagas y enfermedades en la agricultura.

Los resultados de la presente investigación indican que tanto el género *Pseudomonas* como el *Bacillus* presentaron buena actividad de biocontrol en las dos variedades de banano evaluadas. Destacando los aislamientos de *Pseudomonas* P-52 y P-58 que presentaron porcentajes de biocontrol en el cultivar Williams de 96% y 94%, respectivamente y en el cultivar Gran Enano de 70% y 83%. En relación con el grupo *Bacillus* las dos mejores bacterias fueron los aislamientos B-21 y B-50 los cuales tuvieron una actividad de biocontrol en el cultivar Williams de 87% y 84% respectivamente y en el cultivar Gran Enano de 72% y 68%. Es importante destacar que tanto para los aislamientos prospectos de *Pseudomonas* como de *Bacillus*, tuvieron menor actividad de biocontrol en la variedad Gran enano y ese comportamiento se presentó debido a que la tasa de reproducción de *R. similis* fue mayor en el experimento de Williams que en el de Gran Enano. Sin embargo, en ambos cultivares se presentó una buena reducción de la tasa de reproducción de *R. similis*, que son comparables con la actividad de biocontrol usando hongos endofíticos en el cultivar Gran Enano encontrada por Meneses (2003).

En relación con los mecanismos de acción de las bacterias prospectos responsables del biocontrol del nematodo barrenador en banano se desconoce completamente. De hecho, estos resultados son los primero obtenidos en banano mediante el uso de bacterias endofíticas

aisladas de plantaciones comerciales de banano. Sin embargo, en otros patosistemas relacionados con patógenos del suelo, donde se han estudiado los mecanismos de acción de ciertos aislamientos de *Pseudomonas* y *Bacillus* demuestran que pueden participar varios mecanismos de acción como son: antibiosis, producción de enzimas, parasitismos y más recientemente inducción de resistencia (Buchenaer 1998). La presente investigación no tuvo como objetivo estudiar los mecanismos de acción. Sin embargo, es altamente recomendable realizar estudios tendientes a explicar estos mecanismos.

### **7.3 Bioensayos de promoción de crecimiento:**

Las rizobacterias son un grupo específico de bacterias con una alta capacidad de colonizar las raíces y de la mayoría de las plantas superiores y han sido ampliamente relacionadas con un efecto de promoción de crecimiento y mejoramiento de la sanidad del sistema radical de las plantas. Incluso el término de rizobacterias promotoras de crecimiento de las plantas fue acuñado para describir este grupo de bacterias (Klopper y Schroth 1981, Sikora 1992). Los resultados de esta investigación evidencian que el grupo de bacterias endofíticas evaluadas no presentaron un efecto de promoción de crecimiento, expresado por las variables de peso radical, peso foliar, longitud del sistema radical y diámetro de las raíces en comparación con el testigo en las dos variedades de banano estudiadas. Sin embargo, en el cultivar Gran Enano se detectó una ligera tendencia de aumento en el peso radical asociada a aislamientos del género *Bacillus*, pero no existieron diferencias significativas en comparación con el testigo. Sin embargo, en varios cultivos de interés comercial como papa, rábano, tomate, trigo y soya, la aplicación de rizobacterias ha dado como resultado la promoción evidente del crecimiento en plantas, observándose un incremento en la emergencia, vigor, producción de biomasa, desarrollo del sistema radical e incrementos de hasta 30% en la producción de cultivos (Hernández y Escalona 2003). La promoción del crecimiento en las plantas inoculadas con rizobacterias ocurre por varios factores; uno de ellos es la síntesis de ciertas sustancias reguladoras de crecimiento, como giberelinas, citocininas y auxinas, las cuales estimulan la densidad y longitud de los pelos radicales, aumentando así la cantidad de raíces en las plantas.

## 8. CONCLUSIONES

Un total de 242 aislamientos de bacterias endofíticas fueron recobrados de tejidos internos de las raíces de banano provenientes de sitios de alta y baja producción de doce fincas comerciales en Costa Rica.

No se encontraron diferencias en la frecuencia de aislamiento de bacterias entre los sitios de producción alto y bajo en las doce fincas bananeras y los géneros más frecuentemente encontrados en las fincas bananeras fueron *Bacillus* y *Pseudomonas*.

La habilidad de colonización de los aislamientos de *Bacillus* y *Pseudomonas* fue alta en todos los órganos de la planta alcanzando hasta un 97 % para *Pseudomonas* y 95% para *Bacillus*. En general los porcentajes de colonización fueron mayores en las raíces y el cormo de las que en el seudotallo y hojas.

De los 64 aislamientos de bacterias evaluados, 24 aislamientos presentaron porcentajes de penetración inferiores al 4%, siendo estadísticamente diferentes al control con nematodos. Entre las bacterias prospectos sobresalieron para género *Bacillus*, los aislamientos B-56, B-62, B-26, B-37 B-61 y para el grupo de *Pseudomonas* los aislamientos P-46, P-52, P-64, P-58 y P-8.

De los 30 aislamientos de bacterias evaluados para actividad de bioncontrol de *Radopholus similis* en las dos variedades de banano, se encontró que en la variedad Williams, 15 aislamientos tuvieron actividad de biocontrol estadísticamente igual que el nematicida y 6 aislamientos (P-52, B-31, P-58, B-23, B-37 y B-43) tuvieron porcentajes de biocontrol superior o igual al 90%. En la variedad Gran Enano 20 aislamientos se comportaron igual que nematicida y 7 aislamientos (P-8, P-44, P-48, P-58, P-46, B-14) presentaron porcentajes de biocontrol entre 80 a 85 % en comparación con el testigo.

Los aislamientos prospectos del grupo *Pseudomonas* y *Bacillus* que presentaron una actividad de biocontrol contra *Radopholus similis* consistente en las dos variedades de banano fueron

los aislamientos de *Pseudomonas* P-52 y P-58 que presentaron porcentajes de biocontrol en el cultivar Williams de 96% y 94%, respectivamente y el cultivar Gran Enano de 69 % y 83%. En relación al grupo *Bacillus*, las dos mejores bacterias fueron los aislamientos B-21 y B-50 los cuales tuvieron una actividad de biocontrol en el cultivar Williams de 87% y 84% respectivamente y en el cultivar Gran Enano de 72% y 68%.

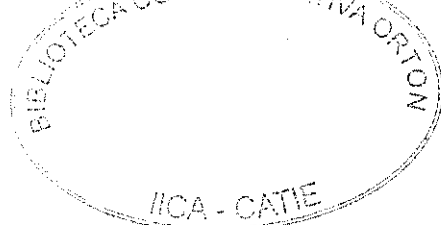
De los 30 aislamientos de bacterias endofíticas evaluados en el bioensayo de promoción de crecimiento, ningún aislamiento presentó diferencias significativas en las variables de crecimiento, expresadas en peso radical, peso foliar, longitud radical, diámetro radical y volumen radical en comparación con el testigo sin inoculación con bacteria.

## 9. RECOMENDACIONES

1. Repetir los ensayos de biocontrol y promoción de crecimiento con los diez mejores aislamientos de bacterias endofíticas.
2. Se recomienda utilizar mezclas de los aislamientos de *Bacillus* (B-21 y B-50) *Pseudomonas* (P-52 y P-58) en ensayos de biocontrol y promoción de crecimiento para conocer si existe un efecto sinérgico de las bacterias que podrían mejorar los porcentajes de biocontrol.
3. Se sugiere realizar estudios de mezclas de bacterias endofíticas con hongos endofíticos en ensayos de biocontrol y promoción de crecimiento con la finalidad de dilucidar si existe un efecto sinérgico entre las bacterias y los hongos que puedan mejorar la eficiencia del biocontrol.
4. Realizar estudios sobre inducción de resistencia utilizando el modelo de “split root system” con la finalidad de identificar si los aislamientos de bacteria prospecto pueden activar procesos de inducción de resistencia contra el nematodo barrenador *Radopholus similis*.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altieri, M.A. 1992. Biodiversidad agroecología y manejo de plagas. Valparaíso. Chile. Centro de Estudios en Tecnologías Apropriadas para América. 162 p.
- Anuratha, C.; Gnanamanickam, S. 1990. Biological control of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum* in India with antagonistic bacteria. Plant and soil. 124:109-116.
- Araya, M.; Centeno, M.; Carrillo, W. 1995. Densidades poblacionales y frecuencia de los nematodos parásitos del banano (*Musa AAA*) en nueve cantones de Costa Rica. CORBANA 20:6-11.
- Arndt, W.; Kolle, C.; Buchenauer, H. 1998. Effectiveness of fluorescent pseudomonads on cucumber and tomato plants under practical conditions and preliminary studies on the mode of action of the antagonist-Z. Pflkrankh. PflSchutz. 105:198-215.
- Baker, R.R.; Paulitz, T.C. 1996. Teorical basis for microbial interactions leading to biological control of soilborne plant pathogens. In May, R. ed. Managing sol borne plant pathogens. Minessota. USA. The American Phytopathological Society. P 50-79.
- Bashan, Y. 1998. *Azospirillum* plant growth –promoting strains are non-photogenic on tomato, Pepper, cotton and wheat. Can. Journal of Microbiology 44: 168-174
- Bechtel, D.B.; Bulla, L.A. 1976. Electron microscope study of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. J. Bacteriol. 127:1472-1481
- Blandón, G. 1996. Caracterización microbiológica cualitativa de la flora presente en el lombricompuesto. Chinchiná, CO, CENICAF. 142p.
- Bravo, A.; Hendrickx, K.; Jansens, S.; Peferoen, M. 1992. Immunocytochemical analysis of specific binding of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins to lepidopteran and coleopteran midgut membranes. Invertebr. Pathol. 60:247-254
- Bridge, J. 1993. Worldwide distribution of the major nematodo parasite of banana .In Biological and integrated control of highghland banana and plantain pest and diseases (EDS. By C.S.Gold and B. Gemmill).Cotonou, Benin. Pp.185-198.
- Buchanan, R.; Gibbons, E. 1974. Bergeys manual for determinative bacteriology. Ed. 8 Williams and Williams Co. Baltimore, USA. 124 p.
- Buchenauer, H. 1998. Biological control of soil-borne diseases by rhizobacteria. Journal of Plant Diseases and Protection 105(4):329-348.
- Burt, G.I.; Dixon, D.G.; Glick B.R. 1998. A plant growth-promoting bacterium that decrease nickel toxicity in seedlings. Applied and Enviromental Microbiology 64:3663-3668.



- Bustamante, E. 1993. Diagnostico de enfermedades bacteriales. Práctica N 5. Curso de Metodología de Diagnostico de plagas. Escuela de Posgrado, CATIE 8 p
- Cabrera, J.A.; Pocasangre, L.E.; Sikora, RA. 2005. Importance and strategies of screening for enhanced biodegradation of pesticides in banana plantations. The global food and product chain. Dynamics, innovations, conflicts, strategies. Poster presentation. Deutscher Tropen Tag. Hohenheim, Stuttgart, Germany.
- Chet, I.; Baker, R. 1980. Induction of suppressiveness to *Rhizotocnia solani* in soil. *Phytopathology* 70:994-98.
- Cook, R.J. 1991. Success with biological control requires new thinking by rhizobacteria. *Plant and soil* 129: 85-92.
- Cronin, D.; Mennen, Y.; Fenton, A. 1997. Bole of 2,4-Diacetylphloroglucinol in the Interactions of the biocontrol *Pseudomonas* Strain F113 with the potato Cyst Nematode *Globodera rostochiensis*. *Applied and Enviromental Microbiology* (63):1357-1361.
- Davide, R. 1996. Overview of nematodos as a limiting factor in *Musa* production. *In* New frontiers in resistance breeding for nematode, Fusarium and Sigatoka. Eds. Frisonn, EA, Horry, J.P. De Waele, D. INIBAP. Montpellier. Fr. 27-31 p
- De Boer, M.; Van der Sluis, I.; Van Loon, L. 1999. Combining fluorescents *Pseudomonas* spp. Strains to enhance suppression of *Fusarium* wilt of radish. *European Journal of Plant Pathology* (105): 201-210.
- Faupel, A. 2004. Charakterisierung des Bakterienspektrums der Kartoffel und dessen Potenzial zur biologischen Bekämpfung des Wurzelgallennematoden *Meloidoyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood. Doktor der Agrarwissenschaften (Dr. agr) der Institut für Pflanzenkrankheiten der Universität Bonn 124 p.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación, IT). 2001. Disponible en <http://www.fao.org>.
- Feitelson, J.S. 1993. The *Bacillus thuringiensis* family tree. *In* Kim, L. ed. Advanced engineered pesticides. Marcel Dekker, Inc., New York, EUA. p. 63-71.
- Fernández, O.; Vega, L. 2001. Bacterias entomopatógenas. *Bacillus thuringiensis*. Tecnologías de Producción. Temas interesantes acerca del control microbiológico de plagas. Instituto de investigaciones de Sanidad Vegetal (inisiv) La Habana-Cuba. 138 p.
- Fogain, R.; Gowen, S.R. 1997. Damage to roots of *Musa* cultivars by *Radopholus similis* with and without protection of nematicides. *Nematropica* 27(1):27-32.
- Ganesan, P.; Gnanamanickam, S. 1987. Biological control of *Sclerotium rolfsii* Sacc. *In* Peanut by inoculation with *Pseudomonas fluorescens*. *Soil Biol. Biochem* 19:35-38.

- Gowen, S.; Quénéhervé, P. 1990. Nematode parasite of banana, plantains and abaca. *In* Plant parasitic nematodes in tropical and subtropical agriculture. Luc, M; Sikora, R; Bridge, eds. CAB International, Wallingford, U.K. 431-460.
- Hallman, J.; Miller, W.; Sikora, A. 2001. Entophytic Colonization of Plants by the Biocontrol Agent *Rhizobium etli* G12 in Relation to *Meloidogyne incognita* Infection. *Biological Control* (91):415-422.
- Hallmann, A.; Kloepper, J.W. 1996. Immunological detection and localization of the cotton endophyte *Enterobacter asburia* JM22 in different plant species. *Can. J. Microbiol.* 42:1144-1154.
- Hallmann, J.; Mahaffee, W.F.; Kloepper, J.W. 1997. Endhophytic bacteria in agricultura crops. *Can. Jour. Microbiol* 43:895-914.
- Helgason, E.; Okstad, O.A.; Caugant, D.A.; Johansen, H.A.; Fouet, A.; Mock, M.; Hegna, I.; Kolsto, A.B. 2000. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*- One species on the basis of genetic evidence. *Appl. Environ. Microbial* 66:2627-2630.
- Hernández, M.; Escalona, M. 2006. Como pueden algunas bacterias y hongos del suelo beneficiar el crecimiento de las plantas?. (En línea). Consultado el 22 de Marzo del 2006. Disponible en <http://www.uv.mx>
- Hervás, A.; Landa, B.; Dantnoff, L. 1998. Effects of commercial and indigenous microorganisms on Fusarium wilt development in chickpea. *Biological Control* (13):166-176.
- Hofmann, C.; Vanderbruggen, H.; Höfte, H.; Van Rie, J.; Jansens, S.; Van Mellaert, H. 1988. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:7844-7848.
- Howell, C.R.; Stipanovic, R.D. 1980. Fungus of disease of tropical crops. Cambridge,US. 440 p.
- Jacobo, M.J.; Bugbee, M.; Gabrielson; D.A. 1985. Enumeration, location, and characterization of endophytic bacteria within sugar beet roots. *Can. Bot.* 63:1262-1265.
- Jaizme, M.C. 1998. Aplicaciones de la micorrizas arbusculares (MA) sobre plataneras micropropagadas. *In* Rosales, FE; Tripon, SC; Cerna, J. eds. Producción de banano-orgánicos/o-ambientalmente. Guácimo, CR, CIID/EARTH/INIBAP. p. 106-123.
- Jeger, M.J. 1996. Monitoring in banana pest management. *Crop Protection* 15(4):391-397.

- Jonathan, E.I.; Barker, K.R.; Abdek-Alim, F.F.; Vrain, T.C.; Dickson, D.W. 2000. Biological control of *Meloidogyne incognita* on tomato and banana with rhizobacteria, actinomycetes, and *Pasteuria penetrans*. *Nematropica* 30(2): 231-240.
- Jones, R. 2000. The genera *Musa* and ensete. In Jones, DR. ed. Disease of banana, abaca and ensete. Wallingford, Oxon, UK. CAB International. P 1-36.
- Kerry, B.R.; Muller, L.A. 1980. Fungal parasites of some plant parasites nematodes. *Nematropica*.
- Khmel, I.A.; Sorokina, T.; Lemanova, N.; Lipasova, V.; Metlitski, 1998. Biological control of crown gall in grapevine and raspberry by two *Pseudomonas* spp. with a wide spectrum of antagonistic activity. *Biocontrol Science and Technology* (8):45-57.
- Kloepper, J.W.; Schroth, M.N.; Miller, T.D. 1990. Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathology* 70:1078-1082.
- Kloepper, J.W.; Schroth, M.N. 1981. Plant growth-promoting rhizobacteria and plant growth under gnotobiotic condition. *Phytopathology*.71:642-644.
- Lifshitz, R.; Kloepper, J.W.; Kozlosky, M.; Simonson, C.; Carlson, J.; Tipping, E.M; Zaleska, I. 1987. Growth promotion of canola (rapeseed) seedling by a strain of *Pseudomonas putida* under gnotobiotic condition.-*Can.J.Pl.Pathol.*33,390-395
- Linderman, R.G. 1992. Vesicular-arbuscular mycorrhizae and soil microbial interactions.- In: Bethlen-Falvay, G.J., R.G. Linderman (eds) *Mycorrhizae in sustainable agriculture*. ASA Special Publication No. 54, Madison. pp 45-70.
- Loper, J.; Corbell, E.; Kraus, N.; Nowack-Thompson, J.; Henkels, M.; Carnegie, S. 1985. Contributions of molecular biology towards understanding mechanisms by which rhizosphere pseudomonads effect biological control.-In: Ryder, M.H.P.M. Stephens, G.D. Bowen (eds.): *Improving plant productivity with rhizosphere bacteria*, pp. 89-96.
- López, P. 2004. Control biológico de nematodos parásitos de plantas. Control biológico de plagas agrícolas. Turrialba, CR, CATIE. p. 189-191. Serie técnica Manual Técnico nº 53
- Mahaffee, W.F.; Kloepper, J.W.; 1997. Temporal changes in the bacterial communities of soil, rhizosphere and endorhiza. *Microb. Ecol.* 34:210-233.
- McSpadden Gardener, B.B. 2004. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural systems. *Phytopathology* 94.1252-1258.



- McSpadden Gardener ,B.B.and Beuerlein, J.B. 2004. Evaluacion of rhizobial inoculants with and without *Bacillus subtilis* MB1600 o soybeans in Ohio, 2003. Biol. Cult. Tests DO 10.1094/BC 19 FCO35. In Program and abstracts.XXXVIII Annual Meeting Reunion Anual.ONTA ,UNA,CORBANA, San José, CR. p. 27.
- Meneses, A. 2003. Utilización de hongos endofíticos provenientes de banano orgánico para el control biológico del nematodo baarrenador *Radopholus similes* (Cobb) Thorne. Tesis Msc.Turrialba, Costa Rica.CATIE.p.67.
- Menjivar, R. 2005. Estudio de potencial antagonista de hongos endofíticos para el biocontrol del nematodo barrenador *Radopholus similis* (Coob) Thorne en plantaciones comerciales de banano en Costa Rica.Tesis MSc.Turrialba, Costa Rica.CATIE.81p.
- Murillo, J.; Rodríguez, P. 1995. Patología Vegetal. Biología Molecular de las interacciones entre plantas y bacterias fitopatógenas Eds. G.Yacer; M.López; A Trapero; A.Bello. Universidad Politécnica de Valencia.España. 558 p.
- Neeno-Eckwall, E.; Schottel, J. 1999. Occurrence of antibiotic resistance in the biological control of potato scab disease. Biological Control (16): 199-208
- O Bannon, J.; Taylor, A. 1968. Migratory endoparasitic nematodes reared on carrot dis.Phytopathology 58: 385.
- Oka, Y.; Nacar, S.; Putievsky, E.; Raved, U.; Yaniv,Z.; Spiegel, Y. 2000. Nematicidal activity of essential oil and their components against the root-knot nematode.Phytopathology 90(7):710-715
- Okumoto, S;. 1992. Efecto de enmiendas sobre bacterias antagonistas a *Alternaria solani* en tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill).Tesis Msc.Turrialba, CR.CATIE. 114 p.
- Pieterse, A. 2001. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance: triggering, signaling and expression.Netherlands. European Journal OF Plant Pathology 107:51-61.
- Pinochet,J. 1986.A note on nematode control practice on banana in Central America. Nematologica, 16 (2): 197-203.
- Pocasangre, L.E.; Menjivar, R.; Zumfelde, A.; Riveros, A.E.; Rosales, F.; Sikora, R. 2006. Hongos endofíticos como agentes biológicos de fitonematodos en banano. XVII Reuniao Internacional de Associacao para a Cooperacao nas Pesquisas sobre Banano no Caribe na América Tropical. Joinville-SantaCatarina-Brasil.ACORBAT.p.249-254.
- Pocasangre L.E.; zumfelde, A. 2004. Manejo alternativo de fitonematodos en banano y platano.XVI Reunión internacional ACORBAT. Publicación especial.p.106-112.

- Pocasangre, L.E. 2002. Mejoramiento biológico de vitroplantas de banano mediante la utilización de hongos endofíticos para el control del nematodo barrenador (*Radopholus similis*), In Riveros, AS; Pocasangre, L; Rosales, FE. 2002. Inducción de resistencia y uso de tecnologías limpias para el manejo de plagas en plantas. Memoria del taller internacional realizado en CATIE, Turrialba Costa Rica, 27-30 de agosto, pp33-39.
- Pocasangre, L.E. 2000. Biological enhancement of banana tissue culture plantlets with endophytic fungi for the control of the burrowing nematode *Radopholus similis* (*Fusarium oxysporium* f.sp cubense. Ph.D. Tesis Universidad de Bonn. 95p
- Pocasangre, L.E.; Sikora, R.; Vilich, V.; Schuster, R. 2000. Survey of banana endophytic fungi from Central America and screening for biological control of *Radopholus similis*. Acta Horticulturae, 53:283-289.
- Quesada, C. 2006. Bacterias endofíticas de la rizosfera del banano para el biocontrol del nematodo barrenador (*Radopholus similis*). Tesis de Ing. Agr. Universidad Nacional de Agricultura, Olancho, Honduras. 51p.
- Rodríguez, G.M.; Morales, J.L.; Chavaría, J.A. 1985. Producción de plátanos (*Musa* AAB, ABB), Turrialba, Costa Rica, departamento de Producción Vegetal. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 74p
- Rosero, R.A. 1987. Banano y plátano: enfermedades y plagas. Medellín.; Colombia. Augura. 68p.
- Ryan, A.; Kinkel, L.L. 1997. Inoculum density and population dynamics of suppressive and pathogenic *Streptomyces* strains and their relationship to biological control of potato scab. Biological Control (10): 180-186.
- Ryder, M.; Yan, Z.; Terrace, T. 1999. Use of strains of *Bacillus* isolated in China to suppress take-all and Rhizotocnia root rot and promotes seedling growth of glasshouse-grown wheat in Australian soils. Soil Biology and Biochemistry (31):19-29.
- Salas, C.R. 2006. Que son las bacterias. (en línea).Caracas ,Venezuela. Consultado el 10 octubre.2006.Universidad Pedagógica Experimental Libertador (UPEL). Disponible en <http://www.quimicayciencias.cjb.net/>.
- Sarah, J.L.; Pinochet, J.; Stanton, J. 1996. El nematodo barrenador del banano *Radopholus similis* Cobb. Plaga de *Musa* – Hoja divulgativa No. 1. Red internacional para el mejoramiento del banano y plátano, Montpellier, Francia.
- Saravanan, T. 2004. *Pseudomonas fluorescens* Induced Enzymological Changes in Banana Roots (Cv. Rasthali) against *Fusarium* Wilt Disease. Plant Pathology Journal 3 (2): 72-80

- Savithiry, N.; Gnanamanickam, S.; 1987. Evaluation of *Pseudomonas fluorescens* for suppression of sheath rot disease and for enhancement of grain yields in rice. *Oryza sativa* L. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:2056-2059
- Scheffer, R.J. 1983. Biological control of Dutch elm disease by *Pseudomonas* species. *Annals of Applied Biology* 103: 21-26.
- Sikora, R.A. 2003. Uso potencial de antagonistas para la protección de las raíces de banano. In: Symposium International: Sistema Radical del Banano: hacia un mejor conocimiento para su manejo productivo. San José. Costa Rica. INIBAP/CORBANA. p74
- Sikora, R.A. 1992. Management of the antagonistic potential in agricultural ecosystems for biological control of plant parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology* 30:245-270
- Sivamani, E.; Gnanamanickam, S. 1988. Biological control of *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense in banana by inoculation of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt pathogens. *Phytopathology* 72:1567-1573.
- Speijer, P.; De Waele, R. 1997. Screening of *Musa* Germoplasm for resistance and tolerance to nematodes. Technical Guidelines. Rome, Italy, IBGR. INIBAP. Montpellier, France. CTA 72. p
- Stover, R.; Simmonds, N. 1987. Bananas. 3rd. edition. Longman Scientific and Technical. England. 467 p.
- Tarté, R.; Pinochet, J.; Gabrielli, C. 1998. Differences in population increase, host preferences and frequency of morphological variants among isolates of the banana RACE of *Radhopolus similis*. *Nematropica*. 11:43-52.
- Terhardt, J. 1998. Beeinflussung mikrobieller Gemeinschaften der Rhizosphäre nach Blattbehandlung von Pflanzen und biologische Kontrolle von *Fusarium oxysporum* f.sp. lycopersici und *Meloidogyne incognita* mit bakteriellen Antagonisten Ph.D. Tesis Universidad de Bonn. 136.p.
- Tzum, S.; Kloepper, J. 1995. Practical application and implementation of induced resistance. In: R. Hammerschmidt y J. Kuc. Eds. Induced resistance to disease plants. The Netherlands, Kluwer academic publishers. P. 152-168.
- Vasanth, D.; Malarvizhi, R.; Sakthivel, N.; Gnanamanickam, S. 1989. Biological control of sheath blight of rice in India with antagonistic bacteria. *Plant and soil* 119:325-330.
- Vilich, V. and Sikora, R.A. 1998. Diversity in soil-borne microbial communities-a tool for biological system management of root health. In *Plant Microbes Interactions and Biological Control*. G.J.; Boland and M.D.; Kuykendall (eds). pp1-4. Inc, New York
- Warren, J.; Bennett, M. 1999. Bio-osmopriming tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) seeds for improved stand establishment. *Seed Science and Technology* (27).489-499.

- Wei, G.; Kloepper, J.W.; Tuzun, S. 1991. Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum* by select strains of plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology* 81: 1508-1512
- Weller, D.M. 1983. Colonization of wheat roots by a fluorescent pseudomonad suppressive to take-all. *Phytopathology* 73:1548-1553
- Whipps, J.M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany. Roots Special Issue.* (52):487-511.
- Wuyts, N. 2003. Metabolitos secundarios en raíces y exudados de raíces y sus implicaciones en la resistencia a nematodos en banano. *In* *Simposium International: Sistema Radical del banano: hacia un mejor conocimiento para su manejo productivo.* San José Costa Rica. INIBAP/CORBANA. p. 92-94.
- zum Felde, A.; Pocasangre, L.E.; Sikora, R. 2006. Detection of in-plant protected with mutualistic fungal endophytes detection de supresividad en hijos de plantas de plantas de banano a *Radhopolus similes*. *In* Program and abstracts. XXXVIII Annual Meeting Reunion Anual. ONTA, UNA, CORBANA, San José, CR. p. 27.
- zum Felde, A.; Pocasangre, L.E.; Sikora, R. 2006. Importance of species and isolates of mutualistic endophytes in promotign systemic induced resistance in banana-one mode of action involved in biocontrol of *Radopholus similes*. *In* Program and abstracts. XXXVIII Annual Meeting Reunion Anual. ONTA, UNA, CORBANA, San José, CR. p. 29.
- zum Felde, A. 2002. Secreening of the endophytic fungi from banana (*Musa*) for antagonistic effects towards the burrowing nematode, *Radopholus similis* (Cobb) Thorne. Thesis Msc. Bonn, Germany. Bonn Universitat. 53 p.

## ANEXOS

**Anexo 1.** Descripción de fincas evaluadas en la Zona Atlántica de Costa Rica.

Fincas estudiadas	Ubicación	Área (ha)
Duacari 2	Guácimo (Limón)	250.90
Frutera	Pococí (Limón)	232.76
El Carmen 1.	Siquirres (Limón)	362.97
El Carmen 2.	Siquirres (Limón)	481.71
El Imperio	Siquirres (Limón)	476.32
Monte Líbano	Matina (Limón)	269.94

Temperatura media anual 25.6°C, máxima 30°, mínima 20.4° C.

Humedad Relativa 80% y 85%.

Precipitación 2800 mm por año.



Mapa de Ubicación de las fincas de la Zona Atlántica

## Anexo 2. Protocolo de preparación de medios de **B-KING**

### Materiales:

20 gr Peptona  
10ml glicerol  
1.5 gr  $K_2HPO_4$  (Potasio fosfatodibásico)  
1.5 gr  $Mg SO_4 \cdot 7H_2O$   
20 gr AGAR  
1 LT de Agua destilada

### Metodología:

Se disuelven 20 g de peptona junto con el glicerol. Se agrega 1.5 g de  $K_2HPO_4$  y los 1.5 g de  $Mg SO_4 \cdot 7 H_2O$  con los 20 gr AGAR. Agregar un litro de agua destilada y autoclavar durante 25 minutos. Por último, colocarlos en platos Petri (15cc por plato) en la cámara de transferencia.

## Anexo 3 . Prueba de Chi cuadrado, tabla de estadísticas de presencia de bacterias *Bacillus* por sitio.

Estadística	DF	Valor	Prob
<b>Chi-Square</b>	<b>1</b>	<b>0.9297</b>	<b>0.3349</b>
Likelihood Ratio Chi-Square	1	0.9292	0.3351
Mantel-Haenszel Chi-Square	1	0.9261	0.3359
Phi Coefficient		0.0601	
Contingency Coefficient		0.0600	
Cramer's V		0.0601	

## Anexo 4 . Prueba de Chi cuadrado, tabla de estadísticas de presencia de bacterias *Pseudomonas* por sitio.

Estadística	DF	Valor	Prob
<b>Chi-Square</b>	<b>1</b>	<b>1.4547</b>	<b>0.2278</b>
Likelihood Ratio Chi-Square	1	1.4478	0.2289
Mantel-Haenszel Chi-Square	1	1.4491	0.2287
Phi Coefficient		0.0752	
Contingency Coefficient		0.0750	
Cramer's V		0.0752	

**Anexo 5.** Prueba de Chi cuadrado, tabla de estadísticas de presencia de bacterias del grupo de **OTRAS** por sitio.

Estadística	DF	Valor	Prob
<b>Chi-Square</b>	<b>1</b>	<b>0.2998</b>	<b>0.5840</b>
Likelihood Ratio Chi-Square	1	0.2993	0.5843
Mantel-Haenszel Chi-Square	1	0.2987	0.5847
Phi Coefficient		0.0342	
Contingency Coefficient		0.0341	
Cramer's V		0.0342	

**Anexo 6.** Analisis de varianza, para **penetración** de *Radopholus similis* en plantas Gran Enano después de la inoculación.

F.V.	SC	DF	CM	F	p-valor
Modelo	129974.51	68	1911.3900	7.31	<b>&lt;0.0001</b>
Tratamiento	129974.51	68	1911.3900	7.31	<b>&lt;0.0001</b>
Error	66938.3775	256	261.4780		
Total	196912.8969	324			

**Anexo 7.** Análisis de varianza de potencial antagonista de bacterias endofíticas para la variedad Williams

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2478.65	32	77.46	12.09	<b>&lt;0.0001</b>
Tratamiento	2478.65	32	77.46	12.09	<b>&lt;0.0001</b>
Error	845.60	132	6.41		
Total	3324.25	164			

**Anexo 8.** Análisis de varianza de potencial antagonista de bacterias endofíticas para la variedad Gran Enano.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	39.65	32	1.24	7.79	<b>&lt;0.0001</b>
Tratamiento	39.65	32	1.24	7.79	<b>&lt;0.0001</b>
Error	20.04	126	0.16		
Total	59.69	158			

**Anexo 9.** Analisis de varianza para la variable peso raíz, **Promoción de Crecimiento** para la variedad **Williams**.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	656.10	30	21.87	2.15	<b>0.0019</b>
Tratamiento	656.10	30	21.87	2.15	<b>0.0019</b>
Error	1263.81	124	10.19		
Total	1919.91	154			

**Anexo 10.** Analisis de varianza para la variable longitud, promocion de crecimiento (Whin Rhizo) para la variedad **Williams**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	5703548.01	30	190118.27	3.05	<b>&lt;0.0001</b>
Trat	5703548.01	30	190118.27	3.05	<b>&lt;0.0001</b>
Error	7731434.36	124	62350.28		
Total	13434982.37	154			

**Anexo 11.** Analisis de varianza para la variable diametro, (Whin Rhizo) promocion de crecimiento **Williams**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1.00	30	0.03	4.97	<b>&lt;0.0001</b>
Trat	1.00	30	0.03	4.97	<b>&lt;0.0001</b>
Error	0.83	124	0.01		
Total	1.83	154			

**Anexo 12.** Analisis de varianza para el variable volumen, (Whin Rhizo) promoción de crecimiento **Williams**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	636.15	30	21.21	4.31	<b>&lt;0.0001</b>
Trat	636.15	30	21.21	4.31	<b>&lt;0.0001</b>
Error	610.48	124	4.92		
Total	1246.63	154			

**Anexo 13.** Analisis de varianza para la variable peso raiz, **Promoción de crecimiento** para la variedad **Gran Enano**.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	137.17	30	4.57	2.75	<b>0.0001</b>
Tratamiento	137.17	30	4.57	2.75	<b>0.0001</b>
Error	204.86	123	1.67		
Total	342.03	153			



**Anexo 14.** Analisis de varianza para la variable longitud, promocion de crecimiento (Whin Rhizo) para la variedad Gran Enano

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	7576058.54	30	252535.28	7.65	<0.0001
Tratamiento	7576058.54	30	252535.28	7.65	<0.0001
Error	4062894.90	123	33031.67		
Total	11638953.44	153			

**Anexo 15.** Analisis de varianza para la variable diametro promocion de crecimiento (Whin Rhizo) para la variedad Gran Enano

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	4.83895959	30	0.16129865	5.82	<0.0001
Tratamiento	4.83895959	30	0.16129865	5.82	<0.0001
Error	3.40929135	123	0.02771782		
Total	8.24825094	153			

**Anexo 16.** Analisis de varianza para el variable volumen promocion de crecimiento (Whin Rhizo) para la variedad Gran Enano

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	183.94955927	30	6.1316531	3.31	<0.0001
Tratamiento	183.94955927	30	6.1316531	3.31	<0.0001
Error	227.7643184	123	1.8517424		
Total	411.7139111	153			