

PASTEURIA PENETRANS: ADHERENCIA Y PARASITISMO EN MELOIDOGYNE INCOGNITA Y MELOIDOGYNE ARABICIDA

T. Rojas Miranda¹ y N. Marbán-Mendoza²

MAG, laboratorio de Nematología, San José Costa Rica, CATIE Proyecto MIP, Turrialba Costa Rica,¹ y Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, Edo. De México, C.P. 56230, Mexico.²

RESUMEN

Rojas, M. T., y N. Marban-Mendoza. 1999. *Pasteuria penetrans*. Adherencia y parasitismo en *Meloidogyne incognita* y *Meloidogyne arabicida*. Nematológica 29:233-240.

Los nematodos son organismos que causan daños severos a los cultivos. Frecuentemente, éstos son controlados por medio de productos químicos, los cuales pueden contaminar los agroecosistemas. Una alternativa para controlar las poblaciones de fitonematodos a niveles no perjudiciales es por medio de controladores naturales. La bacteria *Pasteuria penetrans* es un parásito obligado de nematodos con gran potencial como nematocida biológico. El objetivo primordial del trabajo fue evaluar *P. Penetrans* como agente controlador de los nematodos agalladores *Meloidogyne incognita* y *Meloidogyne arabicida*. Para ello se realizaron pruebas de adherencia de las esporas a la cutícula de juveniles (J2) de los nematodos en mención. Se estudió, a nivel de invernadero, el efecto de la bacteria en el desarrollo de *M. incognita* y *M. arabicida* en raíces de tomate. La adherencia de *P. penetrans* fue evidente a las 24 horas con un promedio de ocho esporas por J2 para *M. incognita* y cuatro esporas para *M. arabicida*, con un 95% de juveniles con esporas adheridas para el primero y un 75% para el segundo. El nematocida ethoprop 5G redujo en un 80% el agallamiento provocado por *M. incognita* y en un 83% en *M. arabicida*. *P. penetrans* redujo en un 44% el agallamiento causado por *M. incognita* y en un 36% en *M. arabicida*. La bacteria disminuyó en un 71.2% la tasa de multiplicación en *M. incognita* y en un 63% en *M. arabicida*. Se observó una mayor patogenicidad de la bacteria para *M. incognita*, con un 45% y un 32% para *M. arabicida*. El efecto de *P. penetrans* a las futuras generaciones de los nematodos fue evidente, ya que se obtuvo un 51% de *M. incognita* de la población final de suelo con esporas de la bacteria adherida a la cutícula y un 22% para *M. arabicida*. Los resultados de adherencia y parasitismo nos hacen suponer que *P. penetrans* es más específico para *M. incognita* que para *M. arabicida* y se concluye que *P. penetrans* puede ser considerado como un nematocida biológico.

Palabras claves: adherencia y parasitismo, control biológico, *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne arabicida*, *Pasteuria penetrans*, tomate.

ABSTRACT

Rojas, M. T., and N. Marban-Mendoza. 1999. *Pasteuria penetrans*. adherence and parasitism in *Meloidogyne incognita* and *Meloidogyne arabicida*. Nematologica 29:233-240.

Plant parasitic nematodes are frequently managed with chemical pesticides which can contaminate agroecosystems. Natural antagonists of nematodes may provide an alternative to the use of pesticides for nematode management. The bacterium *Pasteuria penetrans* is an obligate parasite of nematodes with great potential as a bionematicide. We investigated properties affecting the adherence of *P. penetrans* to the cuticles of juvenile (J2) *Meloidogyne incognita* and *Meloidogyne arabicida*. The effect of *P. penetrans* on the development of *M. incognita* and *M. arabicida* on tomato roots was also evaluated. Adherence of *P. penetrans* was evident 24 hours following inoculation, with an average of eight spores per J2 of *M. incognita* and four spores per J2 of *M. arabicida*. Spores adhered to 95% and 75% of J2 *M. incognita* and *M. arabicida*, respectively. The nematicide ethoprop 5G reduced galling caused by *M. incognita* and *M. arabicida* 80% and 83%, respectively, whereas *P. penetrans* reduced galling by 44% and 36%, respectively. The bacterium decreased the multiplication rate of *M. incognita* by

71% and that of *M. arabicida* by 63%. At the end of the experiment 51% of J2 *M. incognita* and 22% of J2 *M. arabicida* had bacterium spores attached to the cuticle. Our results suggest that this isolate of *P. penetrans* is more virulent to *M. incognita* than to *M. arabicida* and that the bacterium has potential as a biological nematicide.

Key words: biological control, *Meloidogyne arabicida*, *Meloidogyne incognita*, *Pasteuria penetrans*, spore attachment, tomato, virulence.

INTRODUCCIÓN

En Costa Rica, de unos 18 géneros de nematodos fitoparásitos del café, el género *Meloidogyne* es el más importante (Figueroa 1974). Es probable que de la gran diversidad y cantidad de fitonematodos existentes en el suelo, aún no hayan sido descritas todas sus especies. Recientemente, López y Salazar (1989), describieron una nueva especie, la cual denominaron *Meloidogyne arabicida*.

Los fitonematodos han sido combatidos tradicionalmente con sustancias químicas, pero el uso excesivo de éstas sustancias (nematicidas), provoca una gran contaminación al medio ambiente y perjudica la salud humana (Duncan and Noling, 1998; Ramírez y Ramírez 1980).

Por lo anteriormente citado, se están desarrollando otras técnicas, tendientes a dar un manejo adecuado al control de los nematodos. Uno de los organismos más promisorios y con gran potencial biocontrolador es la bacteria *Pasteuria penetrans* (Thorne) Sayre y Starr. Este organismo es un parásito obligado de nematodos, en especial del género *Meloidogyne*, el cual inhibe la producción de masas de huevos y afecta las futuras generaciones (Stirling 1991).

MATERIALES Y METODOS

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

Con el fin de detectar la presencia de esporas de *P. penetrans* adheridas a la cutícula de los nematodos y conocer parte del proceso de parasitismo de la bacteria, se colocaron segundos estadíos juveniles (J2) de *Meloidogyne arabicida* y de *Meloidogyne incognita* en una suspensión de 1 000 000 de esporas/ml y se tomaron muestras de 20 nematodos, cada 2 horas durante 24 horas.

Se evaluó además el efecto de *P. penetrans* en el desarrollo de *M. arabicida* y de *M. incognita* en raíces de tomate, bajo condiciones de invernadero. Con ese propósito, se sembraron plantas de tomate susceptibles a las especies de *Meloidogyne* en macetas, a las que se les inoculó 1 000 juveniles, extraídos de raíces de tomate previamente inoculadas con el propósito de obtener las cantidades de nematodos necesarias para el trabajo. El método empleado para la extracción de nematodos fue el de hipoclorito de sodio (Ferris 1985). Luego de inocular los nematodos se aplicaron a dichas macetas 2 000 000 esporas/ml. El diseño utilizado fue completamente al azar con siete tratamientos y siete repeticiones, donde la unidad experimental fueron las macetas con capacidad de 300 g de suelo estéril. Los tratamientos fueron: Testigo absoluto, *M. arabicida* solo, *M. incognita* solo, *M. arabicida* más *P. penetrans*, *M. incognita* más *P. penetrans*, *M. arabicida* más Ethoprop a 10 ppm, *M. incognita* más Ethoprop a 10 ppm.

Las variables a medir fueron: porcentaje de agallamiento, población final de raíz y suelo, tasa de multiplicación del nematodo, que se obtiene dividiendo

población final y población inicial (1000 J2), resultando la fórmula P_r/P_i ; cuantificación de J2 libres de esporas y con esporas adheridas en sus cutículas en el suelo al finalizar el ensayo, verificación de la patogenicidad de *P. penetrans* en las dos especies de *Meloidogyne*, para lo cual se recolectaron 140 hembras maduras de cada especie las cuales se comprimieron sobre un portaobjetos con el propósito de observar la presencia de endosporas. Los datos fueron transformados a $x + 0.5$ y la duración del ensayo fue de siete semanas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Adherencia de P. penetrans a juveniles de M. arabicida y M. incognita a través el tiempo: El porcentaje de nematodos con esporas y el número de esporas adheridas de *P. penetrans* a la cutícula de juveniles de *M. arabicida* y *M. incognita* se incrementó conforme se aumentó el tiempo de exposición entre la bacteria y los nematodos (Figs. 1, 2). A las 24 horas el promedio de esporas adheridas en la cutícula de *M. incognita* fue de 8, con un porcentaje de adherencia de 95%. El promedio de esporas adheridas para J2 de *M. arabicida* fue de 4 con un porcentaje de *P. penetrans* de 70%. Existieron diferencias significativas ($P < 0.05$) en la cantidad de esporas adheridas a la cutícula de las dos especies de nematodos en estudio.

Estos resultados hacen suponer que la bacteria es mas específica para *M. incognita* que para *M. arabicida*. Es probable que con los promedios de esporas adheridas a la cutícula de los nematodos ocurra la infección o parasitismo. Según Stirling (1984), se necesitan 5 esporas para que ocurra la infestación y un número mayor para afecta la infectividad del nematodo a la planta (Brown y Smart 1985, Davies *et al.* 1988). En el caso de la especificidad, es evidente que *P. penetrans* se adhiere en mayor por-

No. promedio de esporas

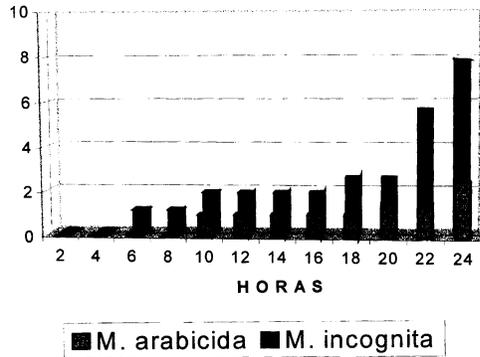


Fig. 1. Número promedio de esporas de *Pasteuria penetrans* adheridas a la cutícula de J2 de *Meloidogyne arabicida* y *M. incognita* en función del tiempo (h).

centaje a *M. incognita* que a *M. arabicida* (Fig. 2). Dutky y Sayre (1978), observaron diferente especificidad de la bacteria a los nematodos *M. incognita* y *Pratylenchus brachyurus*. Davies *et al.* (1988) y Stirling (1991), afirman que esta especificidad se puede dar dentro de un mismo género, como en nuestro caso.

Observaciones realizadas al microscopio electrónica de barrido, mostraron que no hay una preferencia de la bacteria hacia alguna región específica del cuerpo de *M.*

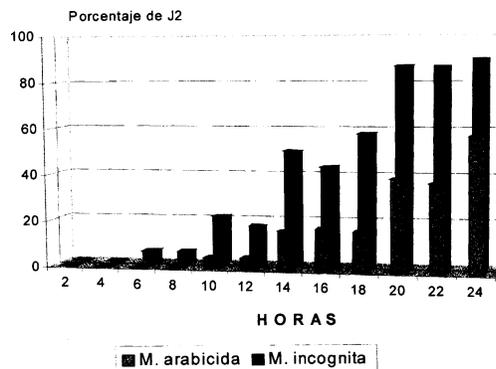


Fig. 2. Porcentaje de J2 de *Meloidogyne arabicida* y *M. incognita* con *Pasteuria penetrans* adherida a su cutícula en función del tiempo (h).

arabica y de *M. incognita*, encontrándose, inclusive, esporas adheridas en las bandas laterales (Fig. 3).

Efecto de P. penetrans en el desarrollo de M. arabica y M. incognita en raíces de tomate bajo condiciones de invernadero: Se encontra-

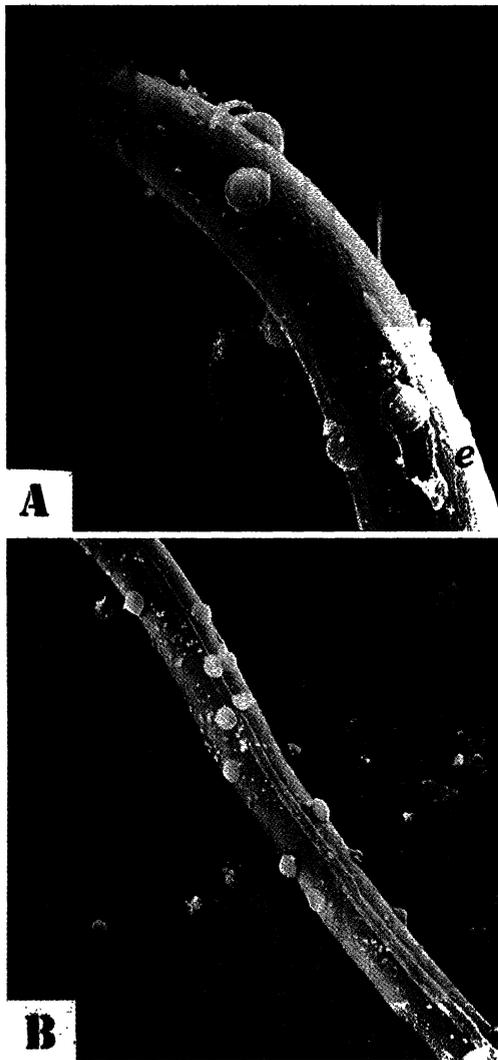
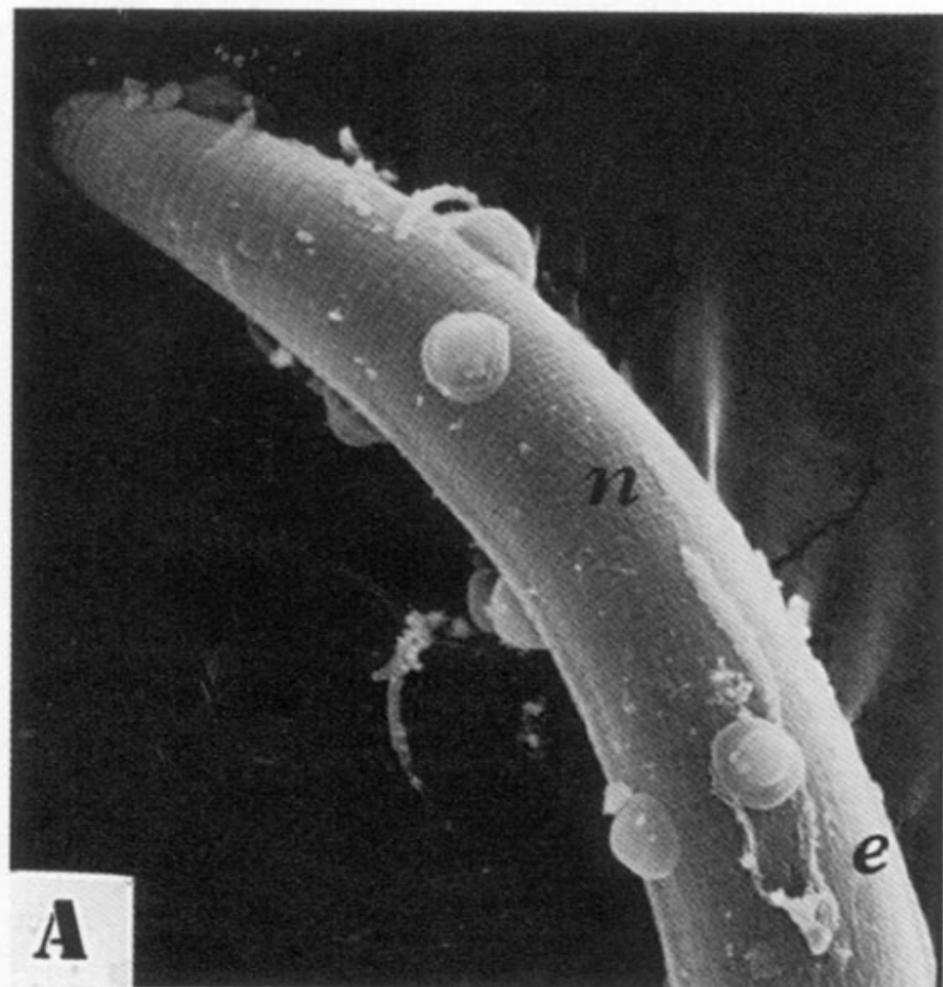


Fig. 3. Esporas de *Pasteuria penetrans* atacando la cutícula de los nematodos. A: Porción anterior de J2 de *Meloidogyne arabica* mostrando gran número de esporas (n: nematodos; e: esporas). (3000×). B: Parte media de *M. incognita* atacada por *P. penetrans* (n: nematodos, e: esporas) (1300×).

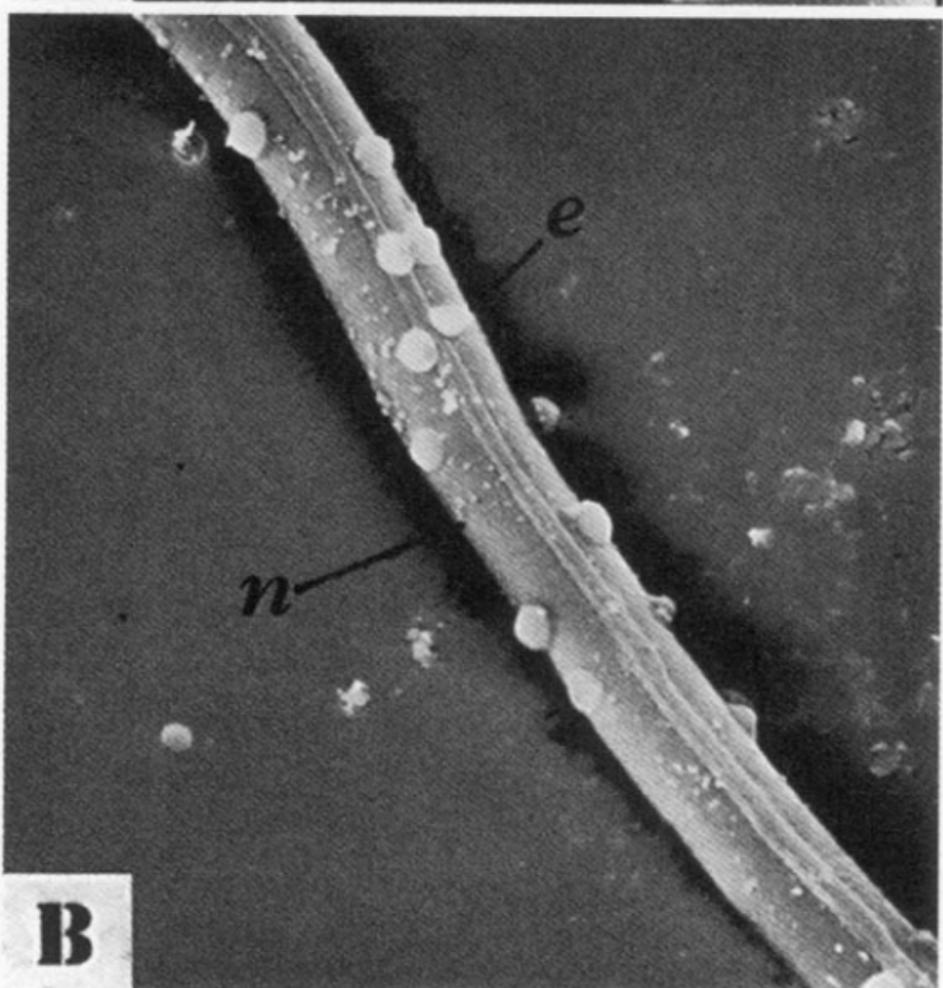
ron diferencias significativas en los porcentajes de agallamiento para los diferentes tratamientos ($P < 0.05$) (Cuadro 1). Estos resultados demuestran que *M. incognita* es más agresivo que *M. arabica* en la multiplicación de su progenie. Se encontró una marcada reducción del porcentaje de agallamiento entre los tratamientos *M. incognita* y *M. arabica* solos, contra los tratamientos donde la bacteria estuvo presente. La reducción de tal porcentaje para *M. incognita* fue de 44.1% y para *M. arabica* fue de 36.5%. Esta capacidad de reducir del agallamiento demuestra que *P. penetrans* tiene potencial para ser usado como un nematicida biológico. Resultados similares a los aquí presentados obtuvieron Stirling (1984) y Dube y Smart (1987), quienes lograron reducir el porcentaje de agallamiento cuando incorporaron preparados con raíces secas cargadas con esporas en campos contaminados con *Meloidogyne* sp.

Al comparar el porcentaje de agallamiento entre *M. incognita* y *M. arabica* solos, contra los tratados con nematicida, existe una reducción promedio de 81%. La diferencia en porcentaje promedio entre los tratamientos con bacteria y con ethoprop es de aproximadamente un 40% a favor del nematicida. Este efecto puede atribuirse a que los nematicidas ejercen un efecto inmediato sobre los nematodos. Una vez que este efecto pasa, los nematodos pueden ser patogénicos (Marbán y Viglierchio 1980). Esta tendencia fue observada por Rojas (1989), en el combate de *M. incognita* con ethoprop, donde las poblaciones del nematodo decrecían en el momento del tratamiento pero tres meses después las mismas aumentaban.

Como se puede observar en el cuadro 1, la reducción en el agallamiento de *P. penetrans* fue de un 40% en promedio, permitiendo sugerir que éste organismo puede ser utilizado eficientemente como controlador de poblaciones de nematodos



A



B

Fig. 3. Esporas de *Pasteuria penetrans* atacando la cutícula de los nematodos. A: Porción anterior de J2 de *Meloidogyne arabicida* mostrando gran número de esporas (n: nematodos; e: esporas). (3000×). B: Parte media de *M. incognita* atacada por *P. penetrans* (n: nematodos, e: esporas) (1300×).

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

Tratamiento	Promedio (%) Agallamiento ^a	Porcentaje de reducción
<i>M. incognita</i>	97.4 a ^a	—
<i>M. arabicida</i>	82.86 a	—
<i>M. incognita</i> + <i>Pasteuria penetrans</i>	53.33 b	44.1
<i>M. arabicida</i> + <i>P. penetrans</i>	46.43 b	36.5
<i>M. incognita</i> + ethoprop	16.93 c	80.5
<i>M. arabicida</i> + ethoprop	2.86 c	83.0
Testigo	0.0	—

^aPromedios seguidos por letras iguales no son significativamente diferentes según la prueba de Duncan con alfa = 0.05.

^bDe acuerdo a la escala de Barker. 1987.

agalladores de las raíces. Además, se podría realizar un manejo integrado de estos nematodos utilizando control químico y control biológico como lo sugieren Daudie *et al.* (1990). En algunos casos, varios investigadores han tenido resultados excelentes, donde la protección del cultivo por medio de *P. penetrans* puede ser similar a la obtenida con el uso de nematicidas, si se utilizan periódicamente (Stirling 1984).

Población final en raíces de M. incognita y M. arabicida y su tasa de multiplicación: Se

obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$) donde *M. incognita* tuvo la mayor población promedio con 5531 juveniles y una tasa de multiplicación de 6.19 y para *M. arabicida* el promedio de población final fue de 2766 juveniles con una tasa de multiplicación de 3.59 (Cuadro 2).

La capacidad de incremento poblacional de *M. incognita* se vio reducida en 71.2% cuando estuvo presente *P. penetrans* y en un 91.6% cuando se trató con etho-

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

Tratamientos	Población final	Tasa de multiplicación	% Reducción
<i>M. incognita</i>	5531.3 a ^a	6.18 a	—
<i>M. arabicida</i>	2766.4 b	3.59 b	—
<i>M. incognita</i> + <i>Pasteuria penetrans</i>	1365.0 c	1.78 c	71.2
<i>M. arabicida</i> + <i>P. penetrans</i>	1136.0 c	1.33 cd	62.9
<i>M. incognita</i> + ethoprop	302.1 d	0.52 de	91.6
<i>M. arabicida</i> + ethoprop	113.6 d	0.19 e	94.7
Testigo	0.0 d	0.00 e	—

^aPromedios seguidos por letras iguales no son significativamente diferentes, según la prueba de Duncan con alfa = 0.05.

prop. Esa misma capacidad de incremento poblacional para *M. arabicida* fue reducida en 62.9% cuando estuvo presente *P. penetrans* y en 94.7% con el ethoprop. Se observa que el nematicida tiene cierta ventaja sobre el control de los nematodos, pero debe entenderse que los organismos antagonistas a los nematodos requieren una serie de condiciones para actuar eficientemente. Además, el efecto de estos organismos, como *P. penetrans* a los nematodos, se da a través de varias generaciones, en tanto que con los nematicidas su efecto es inmediato (Stirling 1991, Mankau 1980, Marbán 1985). Aunque existen estas diferencias, es evidente que el biocontrol de fitonematodos con *P. penetrans* es factible y además no contamina el medio ambiente como lo pueden hacer los compuestos químicos (nematicidas).

Brown y Smart (1985), redujeron las pérdidas causadas por *M. incognita* en los cultivos de tabaco, frijol, soya y arveja cuando incorporaron al suelo *P. penetrans*. También Raj y Mani (1988) disminuyeron de un 48 a un 94% la multiplicación de nematodos noduladores de la raíz cuando emplearon la bacteria.

Comprobación de patogenicidad de P. Penetrans: Se encontró un 45% de *M. incognita* y un 32% de *M. arabicida* parasitadas con *P. penetrans* (Cuadro 3). Estos nos permite inferir que *P. penetrans* es más específico para *M. incognita*, corroborando los resultados obtenidos en el experimentos de adherencia. En las hembras parasitadas se observó la presencia de endosporas de la

bacteria y la ausencia de masas de huevos. Estos criterios permiten considerar a *P. penetrans* como un buen agente biocontrolador de nematodos.

Población final de nematodos en el suelo: Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en las poblaciones finales de nematodos en el suelo (Cuadro 4), observándose las poblaciones más altas para la especie *M. incognita*, ya sea en ausencia o en presencia de los tratamientos con *P. penetrans* y ethoprop.

Al analizar el número de juveniles que presentan esporas de *P. penetrans* adheridas a su cutícula, se encontraron diferencias significativas (Cuadro 4), donde *M. incognita* presentó 214 juveniles con esporas para un 51% y en *M. arabicida* se contaron 51 juveniles con esporas para un 22.8%. Estos resultados confirman los datos obtenidos en la patogenicidad, en el porcentaje de agallamiento y en las poblaciones finales en raíces, con respecto al material utilizado de *P. penetrans*, observándose más especificidad para *M. incognita* que para *M. arabicida*, sin que esta observación nos haga pensar que *P. penetrans* no controle a *M. arabicida*.

La eficiencia de la bacteria depende en gran medida de la cantidad de esporas existentes en el suelo, que puedan parasitar las siguientes generaciones de los nematodos agalladores de la raíz.

Según Mankau (1980), el parasitismo es tan efectivo en macetas que puede exterminar una población de 4 a 5 generaciones. Según la cantidad de esporas de la bacteria

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

Especie de nematodo	Sanas	Enfermas	Hembras enfermas
<i>Meloidogyne arabicida</i>	94	46	32
<i>Meloidogyne incognita</i>	77	63	45

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

Tratamiento	Promedio	Número de juveniles con <i>Pasteuria penetrans</i>	Adherencia (%)
<i>M. incognita</i>	677.6 a'		
<i>M. arabicida</i>	550.3 a		
<i>M. incognita</i> + <i>P. penetrans</i>	418.9 ab	214 a	51
<i>M. arabicida</i> + <i>P. penetrans</i>	223.7 bc	51 b	22.8
<i>M. incognita</i> + ethoprop	211.5 bc		
<i>M. arabicida</i> + ethoprop	78.1 c		
Testigo	0.00 d		

'Promedios seguidos por letras iguales no son significativamente diferentes, según la prueba de Duncan con alfa = 0.05.

existentes en el suelo, es posible disminuir significativamente la patogenicidad de juveniles y prevenir la reproducción del nematodo (Gowen y Channer 1988).

CONCLUSIONES

La adherencia de *P. penetrans* fue evidente a las 24 horas, con promedio de ocho esporas por J2 para *M. incognita* y cuatro esporas para *M. arabicida*, observándose una marcada preferencia de la bacteria para *M. incognita*.

El ethoprop 5G redujo en un 80% el porcentaje de agallamiento para *M. incognita* y de un 83% para *M. arabicida*, mientras que *P. penetrans* redujo el agallamiento de *M. incognita* en 41.1% y para *M. arabicida* en 37%. Como se puede observar la bacteria se podría considerar como un buen nematicida biológico.

La reducción en la tasa de multiplicación para *M. incognita* por medio de *P. penetrans* fue de 71% y para *M. arabicida* de 63%. El nematicida tuvo disminuciones de 92% en *M. incognita* y 95% en *M. arabicida*.

Se observó mayor patogenicidad de la bacteria para *M. incognita* con 45% que para *M. arabicida* con un 32%.

El efecto de *P. penetrans* en las futuras generaciones de los nematodos fue evidente, ya que se obtuvo un 51% de J2 con esporas adheridas para *M. incognita* y un 22% para *M. arabicida*.

LITERATURA CITADA

- BROWN, S. M. y G. C. SMART Jr. (1985). Root penetration by *Meloidogyne incognita* juveniles infected with *Bacillus penetrans*. Journal of Nematology 17:123-126.
- DAUDI, A. T., A. G. CHANNER, R. AHMED y S. R. GOWEN. 1990. *Pasteuria penetrans* a biocontrol agent of *Meloidogyne javanica* in Malawi and in microplots in Pakistan. Brighton Crop Protection Conference, Pests and Diseases. Pp. 253-257.
- DAVIES, K. G., B. R. KERRY y C. A. FLYNN. 1988. Observations on the pathogenicity of *Pasteuria penetrans*, a parasite of root-knot nematodes. Annals of Applied Biology 112:491-501.
- DUBE B. y G. C. SMART Jr. 1987. Biological control of *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* and *Pasteuria penetrans*. Journal of Nematology 19:222-227.
- DUNCAN, L. W. y J. W. NOLING. 1998. Agricultural sustainability and nematode integrated pest management. Pp. 251-288 in K. R. Barker, G. A. Pederson, and G. L. Windham eds. Plant and Nematode Interactions. American Society of Agronomy, Madison, WI, U.S.A.
- DUTKY, E. M. y R. M. SAYRE. 1978. Some factors affecting infection of nematodes by the bacterial

- spore parasite *Bacillus penetrans*. Journal of Nematology 10:285.
- FERRIS, H. 1985. Modelos para la predicción de pérdidas en cosechas y decisiones en el manejo. In M. B. Zuckerman, F. W. Mai y B. M. Harrison, eds. Manual de Laboratorio. (Trad. al español por M.N. Marbán). Centro de Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Montecillos, México. Publicado por CATIE, Turrialba, Costa Rica.
- FIGUEROA, A. 1974. Nematodos en café. Ministerio de Agricultura y Ganadería, Costa Rica. Boletín Técnico 61:90-100.
- GOWEN, S. R. y A. G. CHANNER. 1988. The production of *Pasteuria penetrans* for control of root-knot nematodes. Pp. 1215-1220 in Brighton Crop Protection Conference, Pests and Diseases. Brighton, U.K.
- LOPEZ, R. y L. SALAZAR. 1989. *Meloidogyne arabicida* sp.n. (Nemata: Heteroderidae) nativo de Costa Rica: un nuevo y severo patógeno de café Turrialba (Costa Rica) 39: 279-427.
- MANKAU, R. 1980. Biological control of *Meloidogyne* populations by *Bacillus penetrans* in West Africa. Journal of Nematology 12:230.

Received:

21.VI.1999

Accepted for publication:

25.VIII.1999

Recibido:

Aceptado para publicación: