

Control de *Meloidogyne* spp. con *Pasteuria penetrans* (Thorne) Sayre y Starr¹

Roberto Vargas,² Nelia Acosta,³ Amelia Monllor⁴
y Carlos Betancourt⁵

RESUMEN

Se establecieron tres experimentos de invernadero en el Recinto Universitario de Mayagüez para estudiar el potencial de la bacteria *Pasteuria penetrans* (población de Australia) como biorrepresor del nematodo nodulador *Meloidogyne incognita* en plantas de tomate. Las raíces de plantas inoculadas con el nematodo, infectado, a su vez, por la bacteria, presentaron un índice de inoculación y un número de larvas y huevos de *Meloidogyne* spp. significativamente menor que las de plantas infectadas solo con el nematodo.

ABSTRACT

Control of *Meloidogyne* spp. with *Pasteuria penetrans* (Thorne) Sayre and Starr

Three greenhouse experiments were conducted at the University of Puerto Rico at Mayagüez to study the potential of the bacteria *Pasteuria penetrans* (an Australian population) as a biocontrol agent of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in tomato plants. Roots from plants infected with the nematode and bacteria had significantly lower root-knot indexes, and fewer *Meloidogyne* larvae and eggs than those infected with the nematode only.

INTRODUCCIÓN

La incorporación de enemigos naturales como técnica suplementaria dentro de un programa integrado se ha popularizado en los últimos años (22). En algunos suelos orgánicos hay organismos que actúan como agentes biorrepresores de nematodos, a saber: protozoarios parásitos, artrópodos depredadores, hongos depredadores, procariotas parásitos, hongos endoparásitos, hongos parásitos de huevos, nematodos depredadores y bacterias parásitas (3, 4, 5, 7, 8, 16, 22).

De estos organismos la bacteria *Pasteuria penetrans* (ex Thorne 1940, Sayre y Starr 1985) ha recibido mucha atención por poseer un alto potencial represor sobre el nematodo nodulador, *Meloidogyne* spp. *P. pene-*

¹Manuscrito sometido a la junta editorial el 1 de agosto de 1991.

²Asistente de Investigaciones, Departamento Protección de Cultivos.

³Investigadora, Departamento Protección de Cultivos.

⁴Investigadora Asociada, Departamento Protección de Cultivos.

⁵Catedrático, Departamento Biología, RUM., Mayagüez, P.R.

trans produce una espora de capas corticales gruesas, resistente a la desecación y a algunos fumigantes del suelo (17). Sobrevive por largos períodos en el suelo (3, 12, 13, 16). No posee estructuras especializadas para la locomoción, lo que hace que su diseminación en el suelo dependa en gran medida de la percolación del agua, el tamaño de los poros entre partículas de suelo, prácticas culturales y, en menor grado, por las actividades de algunos invertebrados (3, 7, 12, 13, 15).

El parásito demuestra una sincronización perfecta con el desarrollo y fisiología del nematodo nodulador (3, 8, 9, 16, 20), siendo evidente su parasitismo después de dos mudas del nematodo (fig. 1). La colonización y desarrollo de la bacteria en el interior de una hembra adulta deteriora su sistema reproductivo, disminuye la producción de huevos, retarda la madurez y finalmente le causa la muerte (6, 7, 11, 12, 13, 16, 18).

Pasteuria penetrans representa una opción verdadera como agente biorrepresor del nematodo nodulador. Sus características permiten su utilización simultánea con otros métodos de combate o agentes biocontroladores (22).

Se evaluó el potencial de control de este organismo sobre una población de *M. incognita* en tomate en el invernadero. Se estudió la eficacia de la bacteria para reducir las poblaciones del nematodo y su efecto sobre el crecimiento y desarrollo de plantas de tomate.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se establecieron tres experimentos de invernadero con plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) var. Flora Dade, altamente susceptible al nematodo nodulador. Se trasplantaron plántulas de 5 semanas de edad, provenientes de un vivero comercial a tiestos plásticos de 14 cm. de diámetro que contenían 350 cm³ de una mezcla de suelo 1:1:1 (arena, cachaza y aluvión) con pH de 7.6 y 2.1% de materia orgánica. Antes del trasplante el suelo se esterilizó en autoclave a 15 lb. de presión y a 121°C. por 60 minutos.

El inóculo inicial de *P. penetrans* (población A de Australia) fue suministrado por G. R. Stirling. La población de la bacteria se aumentó y se mantuvo en plantas de tomate en el invernadero utilizando el método desarrollado por Stirling y Wachtel (21).

El primer ensayo comprendió ocho tratamientos; control (sin bacteria, sin nematodo), bacteria (sin nematodo), nematodo (huevos y larvas del segundo estadio juvenil de *M. incognita*), nematodo + bacteria¹ (suspensión diluida 1:1), nematodo + bacteria² (dilución 1:2), nematodo + bacteria³ (dilución 1:4), nematodo + bacteria⁴ (dilución 1:8) y nematodo + bacteria⁵ (dilución 1:16). Se añadieron 5,000 huevos y larvas del nematodo a los tratamientos correspondientes. Las suspensiones de bacteria se prepararon de raíces de plantas de tomate inoculadas con el nematodo

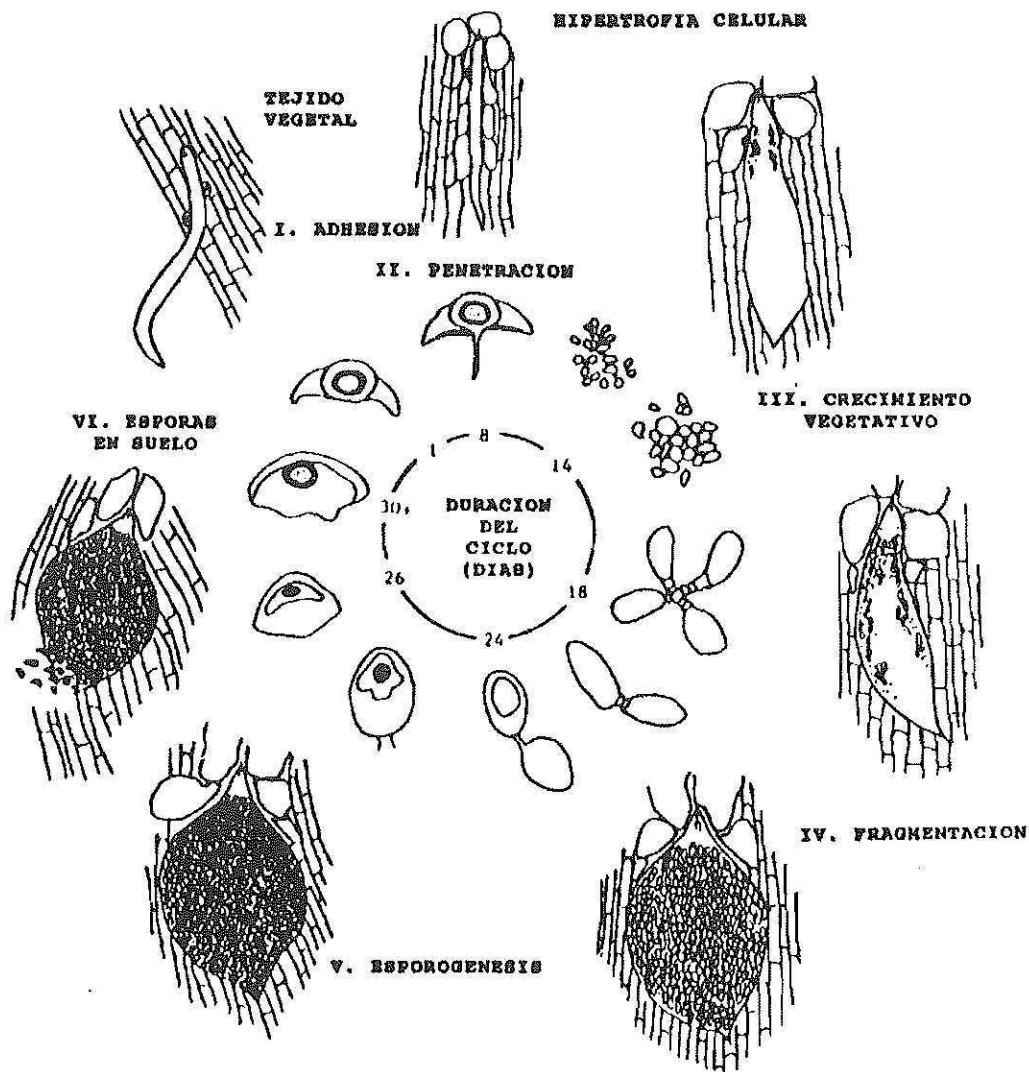


FIG. 1.—Ciclos de vida del nematodo nodulador (*Meloidogyne* spp.) y de la espora de la bacteria parásita de nematodos (*Pasteuria penetrans*). Al centro se ilustran las etapas de desarrollo de *P. penetrans* (ampliadas). [Según Sayre (17) 1980 y Sayre y Wergin (18) 1977; modificación por Roberto Vargas, 1989].

nodulador, infectado por la bacteria. Dichas plantas se mantuvieron en el invernadero por 45 días. Se tomaron las raíces (secas al aire) y se trituraron en un mortero con agua destilada esterilizada y se filtraron por un tamiz #710. La suspensión se diluyó en agua destilada esterilizada en un frasco de 1,000 ml. hasta un volumen de 500 ml. El contenido se vertió en partes iguales en cinco matraces de Erlenmeyer de 250 ml., de donde se hicieron diluciones en serie (1:1 a 1:16) con agua destilada esterilizada. A cada frasco se le añadieron 2 ml. de agua con 5,000 larvas y huevos de *M. incognita* libres de la bacteria. Las larvas del nematodo se extrajeron de las raíces siguiendo el método de Hussey y Barker (2).

Los frascos Erlenmeyer con la suspensión se agitaron por 24 horas en un agitador rotativo (Eberbach Corp., Ann Arbor, Mi.) para permitir la adhesión de la bacteria a las larvas del nematodo. Se utilizó el mismo proceso con todos los tratamientos. Cada una de estas diluciones constituyó un tratamiento de bacteria y nematodo. Las distintas diluciones se aplicaron alrededor del sistema radical de las plántulas de tomate. Se tomaron datos de número inicial de hojas y altura inicial de las plantas. Se utilizó un diseño de bloques completamente aleatorizado (DBCA) con cinco replicaciones por tratamiento.

Cuarenta y cinco días después de la aplicación se tomaron datos de número de hojas, altura de la planta, peso seco del follaje, índice de nodulación y número de huevos y larvas por cada sistema radical. Para el índice de nodulación en raíces se utilizó una escala de 0 a 5, en la que 0 = 0 nódulos, 1 = 1 a 3 nódulos, 2 = 4 a 10 nódulos, 3 = 11 a 30 nódulos, 4 = 31 a 100 nódulos y 5 = más de 100 nódulos (1). Los huevos del nematodo se extrajeron de las raíces utilizando el método de Hussey y Barker (2). Las larvas se extrajeron del suelo y las raíces de las plantas de tomate por métodos convencionales (14).

En el segundo ensayo se incluyeron cuatro tratamientos: control (sin bacteria y sin nematodo), bacteria (polvo bacteriano), nematodo (5,000 larvas y huevos de *Meloidogyne* spp.) y nematodo con bacteria. El polvo bacteriano se obtuvo de raíces de plantas de tomate infectadas por el nematodo y la bacteria, las cuales se secaron al aire y se pulverizaron en una licuadora de alta velocidad por 5 minutos.

Se utilizaron 20 plántulas de tomate. A 10 se les añadieron 5,000 larvas y huevos del nematodo nodulador 7 días después del trasplante. A cinco plántulas se les añadió 1.5 g. del polvo bacteriano (Nem + Bacteria), 3 días después de añadir el nematodo y las otras cinco se dejaron como tratamiento del nematodo solo. De las restantes 10 plántulas sin tratar, cinco se inocularon con 1.5 g. del polvo bacteriano y las otras cinco se dejaron como testigo (sin bacteria y sin nematodo). Cuarenta y cinco días después de la última inoculación se tomaron datos similares a los del primer ensayo y se siguió el mismo procedimiento.

En el tercer ensayo los materiales y procedimientos fueron similares a los del segundo, excepto que en el tercero se incluyeron dos tratamientos adicionales: plantas tratadas con 5,000 larvas y huevos del nematodo más 0.75 g. del polvo bacteriano (Nem + Bacteria¹) y plantas tratadas con 5,000 larvas y huevos del nematodo más 3.0 g. del polvo bacteriano (Nem + Bacteria³). Los datos tomados fueron los mismos que en el segundo ensayo.

Los valores se compararon a base de un análisis de varianza y las diferencias entre las medias se determinaron por la prueba de rangos múltiples de Duncan.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La nodulación en las raíces de las plantas inoculadas con el nematodo solo fue significativamente más que la de los restantes tratamientos (cuadro 1).

Hubo diferencias significativas entre las plantas a las que se les añadió el nematodo solo y las plantas con nematodo más bacteria en cuanto a número de huevos y larvas. Las plantas inoculadas con la densidad mayor de la bacteria (Nem + Bac¹) tuvieron significativamente menos huevos y larvas que las con densidades más bajas. También la nodulación en las raíces de todos los tratamientos de nematodo más bacteria fue significativamente menos que la de las que se les añadió el nematodo solo.

En el segundo ensayo las raíces de las plantas tratadas con el nematodo y la bacteria (Nem + Bac) tuvieron índices de nodulación y número de huevos y larvas significativamente menores que las de las plantas inoculadas con el nematodo solo (cuadro 2).

En el tercer experimento las raíces de las plantas tratadas con una mayor densidad bacteriana (Nem + Bac³) mostraron un índice de nodula-

CUADRO 1.—*Efecto de cinco suspensiones de esporas de Pasteuria penetrans sobre Meloidogyne incognita en tomate (Lycopersicon esculentum L.) cv. Flora Dade (Experimento 1)*

Tratamiento	Reacción en la planta				
	Hojas ¹	Crecimiento ³	Raíces		Follaje peso seco (g)
			Índice nodulación ² (0-5)	Número huevos-larvas ²	
Control	74.8	77.6	0.0 a	0.0 a	8.8
Bacteria	74.0	77.2	0.0 a	0.0 a	9.8
Nematodo	77.2	80.2	4.8 b	41.7 b	9.5
Nem + Bac ¹	75.2	80.6	4.0 c	11.1 c	9.6
Nem + Bac ²	74.5	82.0	4.0 c	17.5 d	9.4
Nem + Bac ³	78.1	81.4	3.8 c	18.2 d	9.6
Nem + Bac ⁴	78.8	81.0	3.8 c	19.8 d	9.9
Nem + Bac ⁵	79.3	78.8	3.8 c	23.3 d	9.9
C.V. (%)	5.5	3.6	18.1 c	42.1	8.3

¹ = % hojas = $\frac{\text{Núm. de hojas final} - \text{Núm. de hojas inicial}}{\text{Núm de hojas final}} \times 100$

² = % Cada valor es la media de 5 replicaciones; valores con igual letra no difieren estadísticamente (P=0.05), según la prueba de rangos múltiples de Duncan; Ind. nodulación 0-5; 0 = ausencia de nódulos; 5 = más de 100 nódulos.

³ = % crecimiento = $\frac{\text{altura final} - \text{altura inicial}}{\text{altura final}} \times 100$

CUADRO 2.—Efecto de *Pasteuria penetrans* (polvo bacteriano) sobre *M. incognita* en tomate (Experimento 2).

Tratamiento	Reacción en la Planta				
	Hojas ²	Crecimiento ³	Índice ¹ (0-5)	Raíces	
				Número huevos-larvas ¹ (miles)	Follaje peso seco (g)
Control	57.7	85.1	0.0 a	0.0 a	11.4
Bacteria	59.9	85.9	0.0 a	0.0 a	12.5
Nemátodo	64.1	86.7	4.2 b	5.7 b	11.0
Nem + Bacteria	62.3	85.4	3.2 c	1.9 c	11.1
C.V. (%)	10.8	3.3	17.8	26.1	16.4

¹ = Cada valor es la media de 5 replicaciones; valores con igual letra no difieren estadísticamente ($P=0.05$) según la prueba de rangos múltiples de Duncan; Ind. nodulación 0-5; 0 = ausencia de nódulos, 5 = más de 100 nódulos.

² = % hojas = $\frac{\text{número de hojas final} - \text{núm. de hojas inicial}}{\text{número de hojas final}} \times 100$

³ = % crecimiento = $\frac{\text{altura final} - \text{altura inicial}}{\text{altura final}} \times 100$

ción y un número de huevos y larvas significativamente menor que los de las plantas tratadas con la densidad bacteriana más baja (Nem + Bac¹) (cuadro 3). Aparentemente las altas densidades del polvo bacteriano les permiten a las esporas un mayor y mejor contacto con el nematodo, lo que disminuye la formación de nódulos y la producción de huevos (19). Hubo diferencias significativas en el número de huevos y larvas entre plantas tratadas con el nematodo y las tratadas con la bacteria. Se observó un patrón similar en el índice de nodulación entre los ensayos. El efecto biorrepresor de la bacteria se demuestra al disminuir el índice de nodulación y el número de huevos y larvas del nematodo en las diferentes suspensiones de la bacteria. Según los índices de nodulación y el número de huevos y larvas, al aumentar la concentración de la bacteria en el suelo, el nematodo se controló más.

El polvo bacteriano es más eficaz que la suspensión de esporas para controlar *M. incognita* en tomate en el invernadero. Teóricamente, todas las esporas añadidas se adhieren a las larvas; los huevos del nematodo quedan libres de la bacteria. De estos huevos libres salen segundos estadios juveniles, los que eventualmente reinfectan la planta. No se han observado esporas de *P. penetrans* adheridas a huevos de nematodos (18). Las pruebas que hemos hecho demuestran que bajo condiciones controladas en el invernadero *Pasteuria penetrans* posee el potencial para causar una disminución significativa del ataque del nematodo

CUADRO 3.—Efecto de tres densidades de *Pasteuria penetrans* (polvo bacteriano) sobre *M. incognita* en tomate (Experimento 3)

Tratamiento	Reacción en la planta				
	Hojas ²	Crecimiento ³	Raíces		
			Indice ¹ nodulación (0-5)	Número ¹ huevo-larvas (miles)	Follaje peso seco (g)
Control	62.4	86.7	0.0 a	0.0 a	12.4
Bacteria	65.5	87.1	0.0 a	0.0 a	12.6
Nemátodo	58.1	87.4	4.2 b	10.1 b	13.8
Nem + Bac ¹	64.5	88.0	3.8 bc	6.9 c	12.6
Nem + Bac ²	61.4	87.1	3.2 c	2.9 d	12.3
Nem + Bac ³	61.6	87.2	2.2 d	1.4 ad	11.7
C.V. (%)	7.3	2.5	25.2	56.9	11.3

¹ = Cada valor es la media de 5 replicaciones; valores con igual letra no difieren estadísticamente ($P=0.5$), según la prueba de rangos múltiples de Duncan; Ind. de nodulación 0-5; 0 = ausencia de nódulos, 5 = más de 100 nódulos.

² = % hojas = $\frac{\text{Núm. de hojas final} - \text{Núm. hojas inicial}}{\text{núm. de hojas final}} \times 100$

³ = % crecimiento = $\frac{\text{altura final} - \text{altura inicial}}{\text{altura final}} \times 100$

nodulador a las plantas susceptibles. Se presume que las altas densidades de la bacteria en el suelo probablemente promuevan un mayor control del nematodo y por ende propicien un mejor desarrollo de la planta. Una disminución en la formación de huevos y larvas podría disminuir considerablemente el daño ocasionado por el nematodo a la siembra siguiente.

BIBLIOGRAFÍA

1. Acosta, N., N. Vicente and J. Toro. 1986. Susceptibility of pigeonpea (*Cajanus cajan*) cultivars and lines to *Meloidogyne javanica*. *Nematropica* 16 (1): 1-10.
2. Hussey, R. and K. R. Barker, 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Dis. Rep.* 57: 1025-028.
3. Jatala, P., 1986. Biological control of plant-parasitic nematodes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 24: 453-89.
4. Kerr, A., 1982. Biological control of soil-borne microbial pathogens and nematodes. In: *Advances in Agricultural Microbiology*, Subba Rao, N.S. Butterworths Scientific, London.
5. Kerry, B. R., 1987. Biological control. In: *Principles and Practice of Nematode Control in Crops*. Brown, R. H. and B. R. Kerry. Academic Press, Australia.
6. Mankau, R., 1975. *Bacillus penetrans* n. comb. causing a virulent disease of plant-parasitic nematodes. *J. Invertebrate Pathol.* 26: 333-39.
7. ———, 1980. Biological control of nematode pests by natural enemies. *Annu. Rev. Phytopathol.* 18: 415-40.

8. ———, 1981. Microbial control of nematodes. *In*: Plant Parasitic Nematodes Vol. III. Zuckerman, B. M. and R. A. Rohde. Academic Press, New York.
9. ——— and J. L. Imbriani, 1975. The life cycle of an endoparasite in some tylenchid nematodes. *Nematologica* 21: 89-94.
10. ———, ——— and A. H. Bell, 1976. SEM observation on nematode cuticle penetration by *Bacillus penetrans*. *J. Nematol.* 8 (2): 179-81.
11. ——— and N. Prasad, 1977. Infectivity of *Bacillus penetrans* in plant-parasitic nematodes. *J. Nematol.* 9 (1): 40-5.
12. ——— and ———, 1972. Possibilities and problems in the use of a sporozoan endoparasite for biological control of plant parasitic nematodes. *Nematologica* 2 (1): 7-8.
13. Prasad, N. and R. Mankau, 1969. Studies on a sporozoan endoparasite of nematodes. *J. Nematol.* 1 (4): 301-02.
14. Román, J., 1978. Fitonematología Tropical. Esta. Exp. Agric., Univ. P.R., Río Piedras, pp. 3-15.
15. Sayre, R. M., 1980. Biocontrol: *Bacillus penetrans* and related parasites of nematodes. *J. Nematol.* 12 (4): 260-70.
16. ———, 1980. Promising organisms for biocontrol of nematodes. *Plant Dis.* 64 (6): 527-32.
17. ——— and M. P. Starr, 1985. *Pasteuria penetrans* (ex. Thorne, 1940) nom. rev., comb. n., a mycelial and endospore forming bacterium parasitic in plant-parasitic nematodes. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* 52 (2): 149-65.
18. ——— and W. P. Wergin, 1977. Bacterial parasite of a plant nematode: Morphology and ultrastructure. *J. Bacteriol.* 129 (2): 1091-101.
19. Stirling, G. R., 1984. Biological control of *Meloidogyne javanica* with *Bacillus penetrans*. *Phytopathol.* 74 (1): 55-60.
20. ———, 1985. Host specificity of *Pasteuria penetrans* within the genus *Meloidogyne*. *Nematologica* 31: 203-09.
21. ——— and M. F. Wachtel, 1980. Mass production of *Bacillus penetrans* for the biological control of root-knot nematodes. *Nematologica* 26: 308-12.
22. Van Gundy, S. D., 1985. Biological control of nematodes: Status and prospects in agricultural IPM systems. pp. 467-78. *In*: Biological Control in Agricultural IPM System. Academic Press, New York.