

UNIVERSIDAD NACIONAL
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA TIERRA Y EL MAR
ESCUELA DE CIENCIAS AGRARIAS

Aislamiento e identificación molecular de la bacteria *Pasteuria penetrans* en fincas bananeras comerciales de la región Caribe de Costa Rica, y su evaluación *in vitro* contra el nematodo barrenador *Radopholus similis* (Thorne) y *Meloidogyne Goeldi*, 1892.

Trabajo final de graduación de tesis sometido a consideración del Tribunal Examinador de la Escuela de Ciencias Agrarias para optar al grado de Licenciado en Ingeniería Agronómica

Estudiante

Luis Carlos Oses Ramírez

Tutor

M. Sc. Alejandro Rodríguez Morales

Asesores

M. Sc. Ana María Conejo Barboza

M. Sc. Alejandro Esquivel Hernández

Campus Omar Dengo

Heredia, Costa Rica, 2017

Aislamiento e identificación molecular de la bacteria *Pasteuria penetrans* en fincas bananeras comerciales de la región Caribe de Costa Rica, y su evaluación *in vitro* contra el nematodo barrenador *Radopholus similis* (Thorne) y *Meloidogyne Goeldi*, 1892.

Estudiante

Luis Carlos Oses Ramirez

Trabajo final de graduación de tesis sometida a consideración del tribunal examinador De la Escuela de Ciencias Agrarias para optar por el grado de Licenciado en Ingeniería Agronómica con énfasis en Agricultura Alternativa y al título de Ingeniero Agrónomo

Trabajo final de graduación presentado como requisito parcial para optar al grado de
licenciado en Ingeniería Agronómica

Tribunal Examinador

M.Sc. Tomás Marino Herrera
Decano de la Facultad de Ciencias De la Tierra y el Mar

M. Sc. Silvia Hernández Villalobos
Representante Escuela de Ciencias Agrarias

M. Sc. Alejandro Rodríguez Morales
Director de Tesis

M. Sc. Ana María Conejo Barboza

Asesora de Tesis

M. Sc. Alejandro Esquivel Hernández

Asesora de Tesis

Luis Carlos Oses Ramírez

Postulante

Resumen

El banano es uno de los alimentos básicos en muchos países en vías de desarrollo y en el mundo. En Costa Rica este cultivo es de gran importancia económica debido a la generación de empleo y divisas por más de US \$833.4 millones. Para mantener un buen rendimiento por hectárea del cultivo, se requiere la aplicación de un paquete tecnológico, así como el adecuado del suelo, un programa nutricional balanceado y el combate integrado de plagas, como último, el uso de nematicidas para el combate de *Radopholus similis*. Debido a la toxicidad de estos productos, es necesario la implementación de Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) y buscar la aplicación de alternativas como el uso de microorganismos que mitiguen el efecto de los nematodos, entre ellos el más importante *Radopholus similis*. Este tipo de micro fauna a nivel experimental y comercial ha tenido mucho éxito. Tal es el caso de la aplicación de la bacteria gram positiva *Pasteuria penetrans* que ha sido muy estudiada y exitosa para el control de nematodos del género *Meloidogyne* sp. El presente estudio tuvo como objetivo Determinar la presencia de *Pasteuria penetrans* en la región Caribe de Costa Rica, por medio de técnicas moleculares y analizar de forma preliminar, su potencial como agente de combate biológico de *Radopholus similis*, bajo condiciones de laboratorio. La prospección se realizó en la región caribeña de Costa Rica en cinco fincas bananeras comerciales, donde se tomaron muestras de suelo rizosférico, suelo extra rizosférico y raíz. Se logró determinar por medio de biología molecular la presencia de la bacteria en finca Cartagena, específicamente en muestras de raíz. Se discute que factores como mayor presencia de *Meloidogyne* y suelos arenosos son los que influyeron en estos resultados. La reproducción y extracción de la bacteria *P. penetrans* se realizó por medio de la metodología de plantas de tomates, se obtuvo una suspensión total de 4ml que corresponde a $2,08 \times 10^6$ endosporas. Para los bioensayos se tomaron dos platos multipozo de veinticuatro pozos cada uno, uno para el tratamiento de endósporas con *R. similis* y el otro para el tratamiento de endósporas con *Meloidogyne* sp. De cada plato, 12 pozos correspondieron a suspensiones del nematodo tratadas con *P. penetrans* y 12 como testigo (solo con agua destilada estéril más nematodo). Se utilizaron 12

repeticiones distribuidas completamente al azar dentro de los 24 pozos de cada plato. La cantidad de endosporas aplicada en cada pozo se calculó en $8,67 \times 10^4$. Estos bioensayos arrojaron como resultados que la concentración fue efectiva a la hora de la adhesión de endosporas a la cutícula de *R. similis* y *Meloidogyne* sp. En el experimento *in vitro*, la aplicación de 8.67×10^4 endósporas/ml a los nematodos, permitió porcentajes de adherencia sobre *Meloidogyne* sp, y *R. similis* del 31.67% y 4.13%, respectivamente. La mortalidad de *R. similis* fue del 0.32% a las 72 horas, y del 4.13% a las 120 horas, reportando diferencias significativas ($p=0.0016$). Se pudo comprobar también que el aislamiento de *P. penetrans* fue más patogénico sobre *Meloidogyne* sp.

Es importante recalcar que en esta investigación queda demostrado a través de pruebas fotográficas, que *P. penetrans* puede adherirse a *R. similis*. Existe información sobre la adherencia de endosporas de *P. penetrans* sobre nematodos con características muy similares a *R. similis* como por ejemplo *Pratylenchus* spp; sin embargo, este nematodo es un hospedero principal de otra especie *Pasteuria thornei*. No hay información que compruebe la adherencia de *P. penetrans* sobre *R. similis* por lo cual esta información puede considerarse como el primer informe sobre el tema.

DEDICATORIA

A Dios por haberme dado la vida.

A mis padres: Xinia Ramírez Chacón y Carlos Oses Chávez, por todo su esfuerzo a través de tantos años.

A mis hermanos que me han brindado su apoyo incondicionalmente, Ana Patricia Oses Ramírez y Emanuel Oses Ramírez por su motivación y compañía durante este proceso.

A Joseph Monge Fuentes, Gabriel Vega Molina, Juan Carlos Retana Guzmán, y José Mora Brenes por ser una parte vital en este trabajo.

Y a todas las personas que de algún modo me han apoyado para concluir la tesis.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Corporación Bananera Nacional (CORBANA) y al director del Centro de Investigaciones, Dr. Jorge Sandoval por la oportunidad de realizar el proyecto de tesis.

Al coordinador Randall Vargas del departamento de nematología de la Corporación Bananera Nacional que participaron en la investigación.

A la Escuela de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional, por la formación profesional.

Al director de tesis M.Sc Alejandro Rodríguez Morales, por la oportunidad que me brindó, los consejos, por guiarme y el apoyo durante la investigación.

A los asesores (as) de tesis M.Sc Ana María Conejo Barbosa, y M.Sc Alejandro Esquivel Hernández por todos sus consejos durante la tesis.

Al Profesor M.Sc Allan González Herrera por la recomendación realizada a la Corporación Bananera Nacional.

A los asistentes José Mora, Gabriel Vega Molina, Juan Carlos Retana Guzmán, que se convirtieron en parte importante de mi vida y ayudaron en la tesis.

A todos esas personas que no mencioné, que de alguna forma participaron y ayudaron a que la investigación se llevara a cabo.

Contenido

1.INTRODUCCIÓN	13
2. OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GENERAL.	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3. REVISIÓN DE LITERATURA	18
3.1 HISTORIA Y ORIGEN DEL BANANO	18
3.2 IMPORTANCIA SOCIO-ECONÓMICA DEL BANANO	18
3.3 PRINCIPALES PROBLEMAS FITOSANITARIOS DEL BANANO	21
3.3.1 <i>Mycosphaerella fijiensis</i> (<i>Sigatoka negra</i>).....	22
3.3.2 <i>Fusarium oxysporum f.sp.cubense</i> (<i>Mal de Panamá</i>).....	22
3.3.3 <i>Ralstonia solanacearum</i> (<i>Marchitez bacteriana</i>).....	23
3.3.4 <i>Nematodos fitoparásitos en el cultivo de banano</i>	24
3.4 NEMATODO BARRENADOR DEL CULTIVO DEL BANANO <i>R. SIMILIS</i> (COBB) THORNE	25
3.4.1 <i>Ciclo de vida</i>	27
3.4.2 <i>Daño al cultivo de banano</i>	27
3.5 MANEJO INTEGRADO DE NEMATODOS	28
3.5.1 <i>Combate químico</i>	29
3.5.2 <i>Combate cultural</i>	31
3.5.3 <i>Combate biológico</i>	32
3.6 COMBATE BIOLÓGICO DE NEMATODOS MEDIANTE HONGOS Y BACTERIAS	33
3.6.1 <i>Utilización de hongos nematófagos</i>	33
3.6.2 <i>Utilización de hongos endófitos</i>	34
3.6.3 <i>Utilización de Bacterias</i>	35
3.7 GÉNERO PASTEURIA SPP.	36
3.7.1 <i>Pasteuria penetrans</i>	36
3.7.2 <i>Ciclo de vida P. penetrans</i>	37
3.7.3 <i>Aspectos ecológicos de P. penetrans</i>	38
3.7.3.1 <i>Temperatura</i>	39
3.7.3.2 <i>Suelo</i>	39
3.7.3.3 <i>Humedad</i>	40
3.7.3.4 <i>Potencial de hidrógeno (pH)</i>	40
3.7.4 <i>Producción comercial de P. penetrans</i>	40
3.8 IDENTIFICACIÓN Y DETECCIÓN DE <i>P. PENETRANS</i> MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES (PCR)	41
4. MATERIALES Y MÉTODOS	43
4.1 UBICACIÓN ESPACIAL Y TEMPORAL	43
4.2 SITIOS DE RECOLECTA DE LAS MUESTRAS	43
4.3 TOMA DE MUESTRAS	45
4.4 CARACTERIZACIÓN DE CONDICIONES EDÁFICAS Y AGROECOLÓGICAS EXISTENTES DE CADA PUNTO DE MUESTREO	46
4.5 ANÁLISIS NEMATOLÓGICO DE RAÍZ	47

4.6 DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LA BACTERIA <i>P. PENETRANS</i> EN MUESTRAS DE RAÍZ Y SUELO PROVENIENTES DE FINCAS BANANERAS.....	48
4.6.1 Extracción de ácidos nucleicos totales de <i>P. penetrans</i> a partir de muestras de raíz y suelo de plantas de banano.....	48
4.6.2 PCR para la detección de <i>P. penetrans</i> en raíz y suelo.....	50
4.6.3 Comprobación de la presencia de <i>Pasteuria penetrans</i> en sitios de muestreo por medio de muestras de raíz y suelo de plantas de banano.....	50
4.7 PRODUCCIÓN Y EXTRACCIÓN DE <i>P. PENETRANS</i> UTILIZANDO PLANTAS DE TOMATE INFECTADAS CON <i>MELOIDOGYNE SP.</i>	51
4.7.1 Extracción de ácidos nucleicos totales de <i>P. penetrans</i> a partir de muestras raíz de plantas de Tomate variedad JR.....	52
4.7.2 Extracción de ácidos nucleicos totales de <i>P. penetrans</i> a partir de nematodos (<i>Meloidogyne sp</i>) extraídos de plantas de tomate.....	53
4.7.3 PCR para la detección de <i>P. penetrans</i> en raíz de plantas de tomate y nematodos (<i>Meloidogyne sp</i>).....	53
4.8 EXTRACCIÓN DE ENDÓSPORAS Y ELABORACIÓN DE LA SUSPENSIÓN MADRE DE <i>P. PENETRANS</i> A PARTIR DE <i>MELOIDOGYNE SP</i> EXTRAÍDOS DE PLANTAS DE TOMATE.....	53
4.9 DISEÑO EXPERIMENTAL	55
4.9.1 Inoculo de nematodos utilizados en la evaluación <i>in vitro</i> con <i>P. penetrans</i>	56
4.9.2 Aplicación de los tratamientos de <i>P. penetrans</i> sobre los nematodos <i>Radopholus similis</i> y <i>Meloidogyne sp</i>	56
4.9.3 EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i> DEL EFECTO DE <i>P. PENETRANS</i> SOBRE LOS NEMATODOS <i>RADOPHOLUS SIMILIS</i>	56
4.9.4 Variables a evaluar	57
5. ANÁLISIS DE LOS DATOS.....	57
6. RESULTADOS	57
6.1 CARACTERIZACIÓN DE CONDICIONES EDÁFICAS, ECOLÓGICAS Y DE MANEJO AGRONÓMICO EXISTENTES DE CADA PUNTO DE MUESTREO.....	57
6.2 ANÁLISIS NEMATOLÓGICO.....	60
6.3 DETECCIÓN DE <i>P. PENETRANS</i> EN MUESTRAS DE RAÍZ DE BANANO, ANALIZADAS POR TÉCNICAS MOLECULARES	61
6.4 DETECCIÓN DE <i>P. PENETRANS</i> EN MUESTRAS DE SUELO RIZOSFÉRICO (SR) Y SUELO EXTRARIZOSFÉRICO (SER) ANALIZADAS POR MÉTODO MOLECULAR	63
6.5 DETECCIÓN DE <i>P. PENETRANS</i> EN MUESTRAS DE RAÍZ DE PLANTAS DE TOMATE VARIEDAD JR (<i>SOLANUM LYCOPERSICUM</i>) ANALIZADAS POR TÉCNICAS MOLECULARES.....	65
6.6 REPRODUCCIÓN DE <i>P. PENETRANS</i> UTILIZANDO PLANTAS DE TOMATE INFECTADAS CON <i>MELOIDOGYNE SP.</i>	66
6.7 DETECCIÓN MOLECULAR DE <i>P. PENETRANS</i> EN <i>MELOIDOGYNE SP</i> EXTRAÍDOS DE RAÍCES DE PLANTAS DE TOMATE (<i>SOLANUM LYCOPERSICUM</i>) EN INVERNADERO	71
6.7 VARIABLES EVALUADAS	72
6.7.1 Estimación del nivel de adherencia de <i>P. penetrans</i> sobre <i>R. similis</i> y <i>Meloidogyne sp</i>	72
6.7.1.1 Evaluación respecto al tiempo de exposición	72
6.7.2. MORTALIDAD DE <i>RADOPHOLUS SIMILIS</i> Y <i>MELOIDOGYNE SP</i> TRATADOS CON <i>PASTEURIA PENETRANS.</i>	74

6.7.2.1. Análisis de la mortalidad de nematodos a las 72 y 120 horas de exposición a <i>P. penetrans</i> , respecto al testigo.....	74
6.7.2.2. Análisis de la mortalidad de los nematodos, respecto al tiempo de exposición con <i>P. penetrans</i>	76
7. DISCUSIÓN	78
7.1 CARACTERIZACIÓN DE CONDICIONES EDÁFICAS, AGROECOLÓGICAS EXISTENTES DE CADA PUNTO DE MUESTREO.....	78
7.2 DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE <i>P. PENETRANS</i> EN MUESTRAS DE RAÍZ DE BANANO Y TOMATE ANALIZADAS POR MÉTODO MOLECULAR.....	81
7.2.1 Detección e identificación de <i>P. penetrans</i> en muestras de suelo rizosférico y suelo extrarizosférico analizadas por método molecular.....	82
7.3 AISLAMIENTO Y MULTIPLICACIÓN DE <i>P. PENETRANS</i> UTILIZANDO PLANTAS DE TOMATE CON <i>MELOIDOGYNE SP.</i>	83
7.4 EXTRACCIÓN DE ENDÓSPORAS DE <i>P. PENETRANS</i> A PARTIR DE <i>MELOIDOGYNE SP.</i>	84
7.5 BIOENSAYO DE <i>P. PENETRANS</i> CON <i>R. SIMILIS</i> Y <i>MELOIDOGYNE SP.</i>	84
8. CONCLUSIONES	87
9. RECOMENDACIONES	88
10. LITERATURA CITADA	89
11. ANEXOS	104
ANEXO 1. INFORMES NEMATOLÓGICOS DE LAS FINCAS MUESTREADAS.....	104
ANEXO 2. ANÁLISIS FÍSICO Y QUÍMICO DE LAS MUESTRAS DE SUELO DE LAS FINCAS MUESTREADAS....	106
ANEXO 3. MUESTRAS ANALIZADAS EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR.	109

Lista de cuadros

CUADRO 1. PRINCIPALES PRODUCTORES DE BANANO EN EL MUNDO, AÑO 2009.....	19
CUADRO 2. PRINCIPALES EXPORTADORES DE BANANO, AÑO 2012	20
CUADRO 3. DESTINO DE LAS EXPORTACIONES DE BANANO DE COSTA RICA, AÑO 2015.....	21
CUADRO 4. CULTIVARES DE BANANO ANALIZADOS SEGÚN LA FINCA VISITADA.	57
CUADRO 5. APLICACIÓN DE RIEGO E INTENSIDAD (CICLOS) DE APLICACIÓN DE FERTILIZANTES EN LAS FINCAS MUESTREADAS.	58
CUADRO 6. MANEJO ALTERNATIVO DE PLAGAS, ENFERMEDADES Y FERTILIZACIÓN MEDIANTE ALTERNATIVAS AMIGABLES CON EL AMBIENTE.	58
CUADRO 7. CONDICIONES EDÁFICAS DE LAS FINCAS MUESTREADAS.....	59
CUADRO 8. NÚMERO PROMEDIO DE NEMATODOS PRESENTES EN 100 G DE RAÍZ, SEGÚN ÁREA MUESTREADA DE CADA FINCA.	60
CUADRO 9. MUESTRAS DE RAÍZ DE FINCAS BANANERAS.....	61
CUADRO 10. COMPROBACIÓN DE RESULTADOS POSITIVOS MEDIANTE BIOLOGÍA MOLECULAR A LA PRESENCIA DE <i>PASTEURIA PENETRANS</i> EN MUESTRAS DE RAÍZ DE LA FINCA CARTAGENA.	63
CUADRO 11. ANÁLISIS DE MUESTRAS DE SUELO PROCEDENTES DE FINCAS BANANERAS.....	64

CUADRO 12. COMPROBACIÓN DE RESULTADOS MEDIANTE BIOLOGÍA MOLECULAR A LA PRESENCIA DE <i>PASTEURIA PENETRANS</i> EN MUESTRAS DE SUELO DE LA FINCA CARTAGENA.	64
CUADRO 13. MUESTRAS DE RAÍZ DE PLANTAS DE TOMATE VARIEDAD JR ANALIZADAS MEDIANTE BIOLOGÍA MOLECULAR PARA DETERMINAR LA PRESENCIA DE <i>P. PENETRANS</i>	65
CUADRO 14. MUESTRAS FRESCAS DE <i>MELOIDOGYNE SP.</i>	71
CUADRO 15. NIVEL DE ADHERENCIA A JUVENILES DE <i>MELOIDOGYNE SP</i> LUEGO 72 Y 120 HORAS DE EXPOSICIÓN CON ENDÓSPORAS DE <i>P. PENETRANS</i>	73
CUADRO 16. NIVEL DE ADHERENCIA DE <i>R. SIMILIS</i> LUEGO 72 Y 120 HORAS DE EXPOSICIÓN CON ENDÓSPORAS DE <i>P. PENETRANS</i>	74
CUADRO 17. MORTALIDAD DE JUVENILES (J2) DE <i>MELOIDOGYNE SP</i> , LUEGO DE 72 HORAS DE CONTACTO CON <i>P. PENETRANS</i>	75
CUADRO 18. EVALUACIÓN DE LA MUERTE CON RESPECTO AL TESTIGO POR MEDIO DE <i>P. PENETRANS</i> EN NEMATODOS DE <i>MELOIDOGYNE SP J2</i> A LAS 120 HORAS.	75
CUADRO 19. EVALUACIÓN DE LA MUERTE CON RESPECTO AL TESTIGO POR MEDIO DE <i>P. PENETRANS</i> EN NEMATODOS DE <i>R. SIMILIS</i> A LAS 72 HORAS.	76
CUADRO 20. EVALUACIÓN DE LA MUERTE CON RESPECTO AL TESTIGO POR MEDIO DE <i>P. PENETRANS</i> EN NEMATODOS DE <i>R. SIMILIS</i> A LAS 120 HORAS.....	76
CUADRO 21. MORTALIDAD DE <i>MELOIDOGYNE SP</i> LUEGO DE 72 Y 120 HORAS DE EXPOSICIÓN CON ENDÓSPORAS DE <i>P. PENETRANS</i>	77
CUADRO 22. MORTALIDAD DE <i>R. SIMILIS</i> LUEGO DE 72 Y 120 HORAS DE EXPOSICIÓN CON ENDÓSPORAS DE <i>P. PENETRANS</i>	77

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. SÍNTOMA DE CABEZA NEGRA EN UNA PLANTA DE BANANO Y MICROORGANISMOS OPORTUNISTAS EN UNA RAÍZ DE BANANO, PRODUCTO DE LAS LESIONES OCASIONADAS POR <i>R. SIMILIS</i>	26
FIGURA 2. ÁREAS ROJIZAS CAUSADAS POR LA INFESTACIÓN DE <i>R. SIMILIS</i> , RAÍCES DE BANANO.	28
FIGURA 3. CICLO DE VIDA DE <i>PASTEURIA PENETRANS</i>	38
FIGURA 4. UBICACIÓN GEOGRÁFICA DE LAS FINCAS BANANERAS MUESTREADAS.	44
FIGURA 5. MUESTREO DE SUELO Y RAÍZ A) PLANTA EN FLORACIÓN O PRÓXIMA A FLORECER, B) HOYO FRENTE AL HIJO DE SUCESIÓN, C) MUESTRA DE SUELO Y RAÍZ.....	46
FIGURA 6. PROCEDIMIENTO UTILIZADO PARA EL AISLAMIENTO Y MULTIPLICACIÓN DE <i>P. PENETRANS</i> UTILIZANDO PLANTAS DE TOMATE (VARIEDAD JR).....	52
FIGURA 7. HEMBRAS ADULTAS DE <i>MELOIDOGYNE SP</i>	54
FIGURA 8. GEL AGAROSA 1% PARA LA AMPLIFICACIÓN DE TRES PARES DE INICIADORES ESPECÍFICOS PARA <i>P. PENETRANS</i> (ATPFF/R, SIGEF/R, SPOIIBF/R) Y CONTROL POSITIVO. FINCA CARTAGENA, MUESTRA DE RAÍZ.....	62
FIGURA 10. GEL AGAROSA 1% PARA LA AMPLIFICACIÓN DE TRES PARES DE INICIADORES ESPECÍFICOS PARA <i>PASTEURIA PENETRANS</i> (SIGEF/R Y ATPF/R). FINCA CARTAGENA MUESTRA DE RAÍZ DE BANANO	63
FIGURA 9. GEL AGAROSA 1% PARA LA AMPLIFICACIÓN DE TRES PARES DE INICIADORES ESPECÍFICOS PARA <i>PASTEURIA PENETRANS</i> (SPOIIBF/R). FINCA CARTAGENA, MUESTRA DE RAÍZ DE BANANO	63

FIGURA 11. GEL AGAROSA AL 1% PARA LA AMPLIFICACIÓN DE TRES PARES DE INICIADORES ESPECÍFICOS PARA <i>PASTEURIA PENETRANS</i> EN PLANTAS DE TOMATE VARIEDAD JR (ATPF/R, SIGEF/R, SPOIIABF/R).....	66
FIGURA 12. RAÍZ DE TOMATE VARIEDAD JR INFECTADA POR <i>MELOIDOGYNE</i> SP.	67
FIGURA 13. NEMATODOS EXTRAÍDOS DE PLANTAS DE TOMATE VARIEDAD JR PARA LA OBTENCIÓN DE ENDÓSPORAS DE <i>P. PENETRANS</i>	67
FIGURA 14. HEMBRAS DE <i>MELOIDOGYNE</i> SP CON POSIBLES ENDÓSPORAS DE <i>P. PENETRANS</i>	68
FIGURA 15. SUSPENSIÓN DE ENDÓSPORAS DE <i>P. PENETRANS</i> A PARTIR DE HEMBRAS DE <i>MELOIDOGYNE</i> SP 40X.....	69
FIGURA 16. A) ENDÓSPORAS DE <i>P. PENETRANS</i> , B) ESTRUCTURAS NO IDENTIFICADAS, SIMILARES A ENDÓSPORAS DE <i>P. PENETRANS</i> DENTRO DEL HUEVO DE <i>MELOIDOGYNE</i> SP. C) HUEVO RECÍEN TRITURADO DE <i>MELOIDOGYNE</i> SP. D) POSIBLES ENDÓSPORAS DE <i>P. PENETRANS</i> SALIENDO DE UN HUEVO RECÍEN TRITURADO 40X.	70
FIGURA 17. ESTRUCTURAS MUY SIMILARES A ENDÓSPORAS DE <i>P. PENETRANS</i> DENTRO DE UN HUEVO DE <i>MELOIDOGYNE</i> SP.	71
FIGURA 18. GEL AGAROSA 1.5% PARA LA AMPLIFICACIÓN DE TRES PARES DE INICIADORES ESPECÍFICOS PARA <i>PASTEURIA PENETRANS</i> (ATPF/R, SIGEF/R, SPOIIABF/R).	72
FIGURA 19. A). <i>MELOIDOGYNE</i> SP. (J2) CON 120 HORAS DE EXPOSICIÓN, PRESENTANDO UNA ENDÓSPORA DE <i>P. PENETRANS</i> ADHERIDA A SU CUTÍCULA. B). FOTOGRAFÍA A 40X DE <i>MELOIDOGYNE</i> SP. (J2) CON 120 HORAS DE EXPOSICIÓN.	73
FIGURA 20. ENDÓSPORAS DE <i>P. PENETRANS</i> ADHERIDAS EN UN JUVENIL DE <i>R. SIMILIS</i> A LAS 120 HORAS. 74	
FIGURA 21. . A) ENDOSPORA DE <i>P. PENETRANS</i> ADHERIDAS A UN JUVENIL DE <i>R. SIMILIS</i> A LAS 72 HORAS DE EXPOSICIÓN B) ENDOSPORA DE <i>P. PENETRANS</i> EN LA REGIÓN ANTERIOR DE UN JUVENIL DE <i>R. SIMILIS</i>	78

1.Introducción

Los productos obtenidos de las musáceas como bananos y plátanos son alimentos básicos en gran cantidad de países del trópico y por supuesto en el mundo. Son cultivos afectados por plagas y enfermedades que pueden ocasionar grandes pérdidas económicas.

En Costa Rica, el área sembrada de banano durante el año 2015 fue de 43.024 hectáreas, con una producción de 100 millones de cajas de fruta y un ingreso de divisas alrededor de US \$833.4 millones, generando un gran desarrollo económico. Esta industria brinda más de 40.000 empleos de manera directa y otros 100.000 de forma indirecta (CORBANA 2015).

Para mantener un buen rendimiento por hectárea del cultivo, se requiere la aplicación de un paquete tecnológico, que incluye: el manejo adecuado del suelo, un programa nutricional balanceado y el combate integrado de plagas.

Dentro de las plagas que afectan al banano, los nematodos fitoparásitos *Radopholus similis* (Cobb, 1893) Thorne, 1949, *Pratylenchus coffeae* Sher y Allen 1953, *Helicotylenchus multicinctus* (Cobb, 1893), *Helicotylenchus dihysteria* (Cobb, 1983), *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White, 1919) Chitwood 1949 y *Meloidogyne* (Treub, 1885) Chitwood 1949, son de gran importancia económica. Provocan la destrucción de raíces, tejidos del corno y disminuyen la absorción de agua y minerales, afectando el crecimiento y el desarrollo de la planta y provocando una severa disminución en el peso del racimo (Stanton 1994).

El nematodo *Radopholus similis* (Thorne) está ampliamente distribuido en América del Sur, América Central y los países del Caribe. *R. similis* es considerado la especie más agresiva en el cultivo del banano. En Costa Rica y Panamá las pérdidas oscilan entre el 30 y el 50%, mientras que en Guatemala y Honduras es entre 10 y 20% (Davide 1996).

El combate de este nematodo se basa en la aplicación de insecticidas-nematicidas granulados y líquidos, que de acuerdo a la Organización Mundial de la salud son catalogados como extremadamente peligrosos. El uso irracional de estos productos, provoca un impacto severo en la biota rizosférica de plantaciones comerciales que han sido explotada intensivamente durante varios años (Araya 2003).

La reducción de la biodiversidad del suelo es consecuencia de varios factores, entre los que se pueden citar: la disminución de la materia orgánica, baja diversidad de plantas presentes en un monocultivo, el uso excesivo de plaguicidas, el uso intensivo del suelo y la deforestación (Altieri y Nicholls 2000). En las plantaciones bananeras de las áreas tropicales, los contenidos de materia orgánica son relativamente bajos (Dorel y Besson 1996), lo cual repercute negativamente sobre la biota rizosférica y sobre la cantidad de enemigos naturales de los nematodos presentes en ella (Ayuso 2002).

En la actualidad la Corporación Bananera Nacional (CORBANA), está promoviendo la implementación de Buenas Prácticas Agrícolas (BPA). Los programas de investigación, están dirigidos a fortalecer la calidad del cultivo y a reducir el uso de plaguicidas. Asimismo, desarrolla estrategias amigables con el ambiente con énfasis en el control biológico, uso de sustancias detergentes y repelentes de insectos, entre otras (CORBANA 2015).

Los Agentes de Control Biológico (ACB) de tipo microbial tienen la capacidad de establecerse en la rizósfera y proporcionar la primera línea de defensa de las raíces contra ataques de patógenos. Son ideales para su uso como agentes de control biológico. Las bacterias y los hongos son los dos grupos más abundantes en el suelo y además, muestran un buen potencial como agentes biocontroladores de nematodos (Siddiqui y Mahmood 1998). Un ejemplo de esto, lo constituye la bacteria *Pasteuria penetrans*, (Gram positiva, formadora de endósporas), la cual ha sido estudiada ampliamente como un parásito obligado de más de 300 especies de nematodos, (Atibalentja et al. 2004), entre las que sobresalen varias especies del género *Meloidogyne* (Chen y Dickson 1998).

P. penetrans produce endósporas que permanecen viables en el suelo por largos períodos. Los nematodos durante la migración hacia las raíces de la planta hospedera, son altamente vulnerables a las endósporas de *P. penetrans* que se adhieren a su cutícula. Cepas específicas de *Pasteuria* spp tienen perfiles definidos de fijación en diferentes poblaciones de nematodos, indicativo de un evento de reconocimiento inicial entre *Pasteuria* y su potencial hospedante. Algunas cepas de *Pasteuria* se adhieren relativamente a pocas especies de nematodos, mientras que otras, tienen perfiles de unión más amplios (Gómez et al. 2010).

El papel de *P. penetrans* en la supresión de nematodos parásitos de las plantas, ha sido evaluado en muchos cultivos, principalmente en ensayos a nivel de invernadero. Estudios realizados por Chen y Dickson (1998), demostraron que la bacteria reduce la tasa de cruzamiento genético de los nematodos y con ello se reduce la densidad de población de *Pratylenchus scribneri* y de agallas radiculares inducidas por *Meloidogyne javanica* y *Meloidogyne incognita* en cultivos como berenjena, garbanzo, kiwi, mango, maní, soya, tabaco, tomate, trigo y pepino. Para entender mejor este microorganismo, es necesario seguir realizando investigaciones tanto de su comportamiento como identificación.

La aplicación de *P. penetrans* junto con hongos nematófagos, ha tenido éxito en la disminución de la multiplicación de los nematodos y en la nodulación de las raíces de tomate y maní, impactando con esto el crecimiento de los cultivos de forma positiva (Piedra 2008). Es por esta razón que se considera que el combate biológico de nematodos mediante *Pasteuria penetrans*, es muy prometedor.

En la actualidad, técnicas en biología molecular permiten una precisa identificación de *P. penetrans*. Entre las técnicas más utilizadas están la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y PCR en tiempo real, que presenta ventajas como especificidad y sensibilidad ante este tipo de microorganismos. Arias et al. (2010), evaluaron la técnica en la detección de bacterias concluyendo que PCR es un excelente método de identificación de microorganismos. La rapidez de las técnicas moleculares permite tener un diagnóstico en un menor tiempo y reduce los costos.

Debido a la sensibilidad y especificidad de las técnicas moleculares, ha sido posible la detección de *P. penetrans* y de otras especies dentro del género *Pasteuria*. En ese sentido, Trotter y Bishop (2003), utilizaron iniciadores basados en el gen *spollA* para la detección de *P. penetrans* (SpollAF2 y SpollAR1) y *P. ramosa* (SpollAF3 y PpSpollAR). Las investigaciones de Altibalentja et al. (2004), lograron amplificar el gen 16S rDNA de *Pasteuria* spp por medio de un primer par de iniciadores (27F y 440R), y mediante un segundo par de iniciadores (440R y 1492R), se obtuvo la detección de *Pasteuria penetrans* por medio de PCR convencional. Así mismo, se ha logrado identificar endósporas de varios géneros de *Pasteuria* en diferentes nematodos por medio de PCR, utilizando los iniciadores 39F y Psp16Sr1, además de Psp16Sf9 y Psp16Sr5 (Mohan et al. 2011).

Nong et al. (2007) utilizaron 12 marcadores moleculares para determinar variaciones genotípicas de *P. penetrans* utilizando la técnica PCR en tiempo real. Schmidt et al. (2004), diseñaron tres pares de iniciadores específicos: *spollAB f/r*, *atpf f/r* y *sigE f/r*, para detectar la presencia de *P. penetrans* por medio del PCR en tiempo real en nematodos fitoparásitos, con la ventaja de poseer la capacidad de detectar el genoma de interés en tiempo real.

Talavera et al. (2002), demostraron el efecto beneficioso de las aplicaciones conjuntas de *P. penetrans* y hongos micorrízicos arbusculares; cuando ambos organismos fueron aplicados al suelo infestado por *M. incognita*, se observó una disminución significativa de las poblaciones del nematodo y un aumento del crecimiento de las plantas de tomate y en su tolerancia a las infestaciones por estos organismos.

El presente estudio tuvo como objetivo principal determinar la presencia de *Pasteuria penetrans* en fincas bananeras comerciales de la región Caribe de Costa Rica, por medio de técnicas moleculares, y evaluar de forma preliminar, su potencial como agente de combate biológico de *Radopholus similis* bajo condiciones de laboratorio.

2. Objetivos.

2.1 Objetivo General.

- Determinar la presencia de *Pasteuria penetrans* en la región Caribe de Costa Rica, por medio de técnicas moleculares y analizar de forma preliminar, su potencial como agente de combate biológico de *Radopholus similis*, bajo condiciones de laboratorio.

2.2 Objetivos específicos.

- Identificar mediante la técnica de PCR la presencia de la bacteria *Pasteuria penetrans* en muestras de suelo y raíz, provenientes de 5 fincas bananeras.
- Caracterizar las condiciones edáficas y de manejo agronómico de las fincas, asociadas a la presencia/ausencia de *Pasteuria penetrans* en los sitios muestreados.
- Implementar una metodología para obtener cepas nativas de *Pasteuria penetrans* a partir de suelo y plantas de tomate infectadas con *Meloidogyne* sp.
- Evaluar a nivel de laboratorio, el efecto de *Pasteuria penetrans*, sobre *Radopholus similis* y *Meloidogyne* sp.

3. Revisión de literatura

3.1 Historia y origen del banano

El centro de origen del banano se ubica al sudeste de Asia, específicamente en las junglas de Malasia, Filipinas e Indonesia (Tropical fruits trading 2011). Se incluye el noroeste de la India, Burma, Camboya y algunas partes de la China del Sur, así como las Islas Mayores de Sumatra, Java, Borneo, Taiwán; y de ahí se ha distribuido al resto del mundo (Soto 1995, citado por Rojas 2011).

En Costa Rica el banano fue traído por Fray Tomás de Berlanga desde las islas Caimán. El establecimiento del cultivo, estuvo ligado a la construcción y desarrollo del ferrocarril de San José a Limón. Al inicio, las plantaciones más importantes se ubicaron en el Valle del río Zent, posiblemente por su cercanía con el puerto de Limón. Debido a estudios geográficos realizados por Henry Pittier, se determinó, que las llanuras y condiciones climáticas del Pacífico Sur, eran ideales para la siembra del banano (CORBANA 2013).

Desde 1880, año en que se registró la primera exportación de banano a Estados Unidos, su producción y exportación no ha cesado; por el contrario, se ha fortalecido. La actividad se ha mantenido entre las primeras en importancia económica en Costa Rica, tanto por la generación de empleo, como por las divisas que aporta al país (CORBANA 2013).

3.2 Importancia socio-económica del banano

El banano (*Musa AAA*) es un cultivo de gran importancia socio-económica. De acuerdo a los datos de la FAO (2014) a nivel mundial, la producción de esta fruta fue aproximadamente de 89,413.104 toneladas para el 2007; en tanto que, para el 2009, se obtuvo una producción de 95,595.96 toneladas. El banano es además uno de los principales cultivos tropicales en el mundo y la base alimenticia de millones de personas en muchos países en vías de desarrollo. En África, representa el componente principal de la dieta (Marín et al. 2002).

Cerca del 60% de la producción del banano se da y se consume en África Oeste y Central, y representa un aporte diario de 200 calorías para los habitantes (Taminola et al. 2013). En el cuadro 1 se muestran los principales productores de banano en el mundo para el 2009, siendo Filipinas, China y Ecuador, los tres primeros lugares.

Cuadro 1. Principales productores de banano en el mundo, año 2009

PAÍS	TM
Filipinas	9,013,186
China	8,207,702
Ecuador	7,637,324
Brasil	7,193,189
Indonesia	6,273,056
Costa Rica	2,127,000
Colombia	2,020,393
Tailandia	1,528,082
Egipto	1,100,000
Camerún	820,000
Honduras	690,625
Malasia	625,000
España	384,000
Sudáfrica	373,637

Fuente: FAOSTAT 2014

Con respecto a la exportación mundial, la oferta de banano ha sido liderada en los últimos años principalmente por 5 países americanos uno asiático. Ecuador es el principal exportador, seguido de Filipinas, Costa Rica, Guatemala y Colombia. En el cuadro 2 muestra los principales exportadores de banano para el año 2012 (FAO 2014).

Cuadro 2. Principales exportadores de banano, año 2012

Exportadores	Exportación bruta	
	TM	%
Ecuador	4 982.1	30.20
Filipinas	2 646.1	16.04
Costa Rica	2 028.6	12.30
Guatemala	1 920.8	11.64
Colombia	1 834.9	11.12
El mundo	16 494.8	100%

Fuente: FAO 2014.

En países del primer mundo, el banano es muy apetecido para su consumo como fruta fresca (CORBANA 2011); y es por esto que gastan millones de dólares en importaciones. A nivel mundial en el año 2009, Estados Unidos importó \$1,898.74 millones, representando el 16.51% del total de las importaciones, seguido por Bélgica, con \$1,623.74 millones y Alemania con \$1,024.54 millones.

El 85% de la producción nacional se exporta, y el resto se queda en el mercado local para venta de fruta fresca, o bien, para la fabricación de otros subproductos. Costa Rica en el 2013 sobrepasó a Colombia en cuanto a la exportación de banano en el *ranking* exportador. El banano logró desbancar al café que por muchísimos años lideró las exportaciones agrícolas. El país cuenta con cerca de 180 fincas bananeras situadas principalmente en los cantones de Pococí, Siquirres, Matina, Guácimo, Limón y Talamanca (Camacho 2013).

De acuerdo a datos de CORBANA (2014), la producción bananera de Costa Rica se ha destinado principalmente a Estados Unidos y a la Unión Europea (UE). En el año 2014 y 2015 el primero de los destinos fue la UE donde se consumió 55.2% de la fruta nacional y el segundo fue los Estados Unidos donde se consumió el 36%. El cuadro 3 muestra porcentualmente el destino de banano costarricense en el 2015.

Cuadro 3. Destino de las exportaciones de banano de Costa Rica, año 2015

Destino	%
USA	36
Italia	11.3
Inglaterra	8.3
Bélgica	7.5
Alemania	7.7
Holanda	4
España	3.4
Otros	21.8

Fuente: CORBANA 2015.

Para el sector caribeño de Costa Rica, el cultivo de banano genera muchas fuentes de trabajo. Se estima que en el año 2015, el sector bananero generó el 74% del empleo directo e indirecto de la región Huetar Atlántica; lo cual representa 40.000 empleos directos y alrededor de 100.000 indirectos (CORBANA 2015).

3.3 Principales problemas fitosanitarios del banano

El cultivo de banano es susceptible a enfermedades fungosas, bacterianas, virales, al ataque de insectos y nematodos. Después de la Sigatoka negra, enfermedad considerada como el principal problema fitosanitario que afecta al banano a nivel mundial, los nematodos fitoparásitos, son considerados como el segundo problema que afronta el banano. En tercer lugar se señala a la bacteria *Ralstonia solanacearum* (agente causal de la marchitez bacteriana) y en cuarto lugar, al hongo *Fusarium oxysporum* f.sp.cubense (agente causal del mal de Panamá) (Araya 2003).

3.3.1 *Mycosphaerella fijiensis* (Sigatoka negra)

La Sigatoka negra es una enfermedad causada por el hongo ascomicete *Mycosphaerella fijiensis* (Morelet). Es el principal problema fitopatológico del banano y el plátano en América Latina, Asia y África (Hidalgo et al. 2006). El patógeno destruye rápidamente el tejido foliar, reduciendo la fotosíntesis y afectando el crecimiento de la planta y la producción (Martínez et al. 2011).

Esta enfermedad se disemina por medio de ascosporas y conidios. Las ascosporas son producidas en la fase sexual del hongo. Son diseminadas principalmente por medio del viento, la lluvia y el rocío del agua. Las ascosporas son capaces de recorrer grandes distancias y por consiguiente llegar a otras plantaciones (Marín et al. 2002). El desarrollo de la enfermedad es favorecido bajo condiciones de alta humedad y precipitación. Las temperaturas menores a 20°C y periodos secos inhiben el crecimiento del hongo (Manzo et al. 2005).

Debido a sus características biológicas de mayor producción de ascosporas, mayor número de ciclos sexuales por año y una tasa elevada de colonización de tejidos, la Sigatoka negra logra rápidamente predominar sobre otras enfermedades foliares del banano menos agresivas (Romero 2003). En Costa Rica, los costos del combate de la enfermedad pueden alcanzar los \$1500 h⁻¹ año⁻¹ y por consiguiente, puede amenazar seriamente la competitividad de la industria. En ausencia de medidas de combate, la enfermedad puede causar la pérdida de hasta el 100% de la producción debido al deterioro de la calidad (longitud y grosor del fruto) (Martínez et al. 2011).

3.3.2 *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (Mal de Panamá)

Esta enfermedad merece gran atención debido a que provoca grandes pérdidas económicas en el cultivo del banano. El mal de Panamá es causado por el hongo *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, que produce estructuras resistentes y le confiere la capacidad de sobrevivir en el suelo por largos periodos de tiempo, aún en ausencia de plantas de banano (Rodríguez 2012).

Este patógeno destruyó en la década de 1950 las plantaciones de banano del cultivar Gros Michel y motivó la siembra de cultivares del subgrupo Cavendish, resistentes a la raza 1 y 2. No obstante, en la actualidad, la raza 4 tropical de *F. oxysporum* f.sp. cubense (Foc TR4) tiene en alerta a América Latina y el Caribe debido a la detección en el sudeste asiático en 1990 como agente patológico de los cultivares del subgrupo Cavendish (Rodríguez 2014). En países como Taiwán, Malasia, Indonesia, China, Filipinas y el Norte de Australia, más de 8 millones de plantas en sistemas tradicionales y más de 5000 ha de plantaciones comerciales del cultivar Cavendish, han sido afectadas (Lara 2009). De acuerdo a FAO (2014) este patógeno se ha reportado en varios países africanos como Jordania y Mozambique.

La raza 4 ataca al subgrupo Cavendish (AAA) y a todos los cultivares susceptibles a la raza 1 y raza 2 del patógeno (Lara 2009). La manera en que la planta se infecta es por la raíz y cormo directamente o bien por heridas y cortes. Una vez dentro de la planta se establece en el interior del sistema vascular, dificultando el movimiento de agua y de los nutrientes. La parte afectada tiende a emitir hijos de menor desarrollo y más proclives a manifestar la enfermedad (Rodríguez 2012).

3.3.3 *Ralstonia solanacearum* (Marchitez bacteriana)

Esta enfermedad es considerada de importancia económica para los países tropicales y subtropicales exportadores de musáceas. Afecta todos los estadios de la planta, se disemina fácilmente, por lo que es un factor determinante en la producción de banano. Se encuentra ampliamente distribuida en Centroamérica, Sudamérica y el Caribe (Martínez 2013).

La bacteria *Ralstonia solanacearum* sin. *Pseudomonas solanacearum*, causa la marchitez, hereque o moko en la mayoría de las musáceas, incluyendo a plátanos y bananos. Causado por la raza 2 de esta bacteria, es una de las enfermedades más destructivas y una seria amenaza para el cultivo (Hernández 2010). En Costa Rica, durante mucho tiempo la enfermedad estuvo bajo control y su incidencia fue baja. Sin embargo, en los últimos años, se ha notado un resurgir del problema,

con un evidente aumento en el número de casos y de fincas con presencia de la enfermedad (Martínez y Guzmán 2011).

Esta bacteria es un organismo muy versátil, vive libremente en simbiosis de manera latente, o como es habitual, de forma parasitaria. El sistema de clasificación de la bacteria es por razas (biovarias secuevarias y filotipos) y está regido por el rango de hospederos, patogenicidad, distribución geográfica y diferencias genéticas. Se disemina por medio de insectos, agua, materiales vegetativas, malezas y herramientas utilizadas en las labores agrícolas (Martínez y Guzmán 2011).

3.3.4 Nematodos fitoparásitos en el cultivo de banano

Los nematodos son una de las limitantes más importantes para el cultivo de banano. Entre los nematodos fitoparásitos más destructores y ampliamente distribuidos se encuentran los endoparásitos migratorios *Radopholus similis* y *Pratylenchus coffeae*, así como el semiendoparásito *Helicotylenchus multicinctus*. En un segundo plano, se encuentran las especies del nematodo endoparásito sedentario *Meloidogyne* sp., *R. similis* es el de mayor importancia para el cultivo de banano en Costa Rica. En general se establece la importancia económica de manera decreciente: *R. similis* > *Helicotylenchus* spp > *Meloidogyne* spp > *Pratylenchus* spp. (Araya 2003).

Los nematodos son organismos filiformes, con cuerpo sin segmentos y más o menos transparentes. Están cubiertos de una cutícula hialina, que está marcada por estrías u otras marcas; son redondeados en sección transversal, con boca, sin extremidades u otros apéndices. Las hembras de algunas especies, en su estado adulto son abultadas con forma de pera o esfera (Siddiqi, 2000; Agrios, 2005; Perry y Moens, 2006).

Es muy común encontrar comunidades poliespecíficas compuestas por endoparásitos migratorios en plantaciones con varios años de establecidas, como *R. similis* (Cobb, 1893) y *Pratylenchus coffeae* Sher y Allen 1953; los ecto-

endoparásitos *Helicotylenchus multicinctus* (Cobb, 1893) y *H. dihysteria* (Cobb, 1983); los endoparásitos sedentarios *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White, 1919) Chitwood 1949 y *M. javanica* (Treub, 1885) Chitwood 1949 y el semi-endoparásito *Rotylenchulus reniformis* Lindford y Oliveira 1940 (Araya, 2003; Araya 2004; Gowen et al. 2005; Martínez et al. 2011). En adición a estas cinco especies, hay muchas otras que han sido registradas en *musáceas* en todo el mundo (Gowen et al. 2005). No obstante, la frecuencia y abundancia de cada una de estas especies, puede cambiar según sea la variedad de plátano o banano y por supuesto, las condiciones agroecológicas a que este sometido el cultivo (Araya 2003).

3.4 Nematodo barrenador del cultivo del banano *R. similis* (Cobb) Thorne

De acuerdo con las frecuencias y densidades poblacionales, así como a la época del año, en las zonas productoras de plátano y banano, *R. similis* es el más abundante y la principal especie fitoparásita, constituyendo entre el 82 y 97% de la población de nematodos en raíces y cormos (Araya 2003; y Moens et al. 2003). Cuando este nematodo no es controlado, se disminuye el peso de los racimos y, por efecto del volcamiento, se reduce el rendimiento entre 52 y 60% en la primera y segunda cosecha, respectivamente (Fogain 2000); sin embargo, la reducción en el rendimiento puede llegar hasta un 80% (Moens et al. 2004).

R. similis es el nematodo de mayor importancia agrícola en las zonas de producción de banano intertropicales. La propagación de este microorganismo se da por medio de rizomas o hijuelos infectados (Sarah et al. 1996). En un lapso de 15 años, se convirtió en el principal fitoparásito del banano en regiones tropicales y subtropicales debido al cambio de Gros Michel, por el subgrupo Cavendish entre 1958 y 1970 (Cocom 2005).

R. similis es un endoparásito migratorio obligado, lo que significa que se encuentra dentro del sistema radical de las plantas hospederas (plátano, banano, ornamentales y malezas). Es capaz de terminar su ciclo de vida dentro de la raíz

de la planta (Marín et al. 2002). Este nematodo se alimenta básicamente de los líquidos de las células de la raíz y su reproducción es sexual, pero también se presenta la partenogénesis (Esquivel 2011).

Bajo condiciones muy severas de infestación, se puede producir necrosamiento de los tejidos debido a la acción de microorganismos oportunistas como hongos y bacterias (Araya 2003). Dentro de éstos, los más comunes son *Cylindrocarpon musae*, *Acremonium stromaticum* y *Fusarium* spp. (Sarah et al. 1996). A este síntoma se conoce como “cabeza negra” (Figura.1) (Guzmán, 2011).



Figura 1. Síntoma de cabeza negra en una planta de banano y Microorganismos oportunistas en una raíz de banano, producto de las lesiones ocasionadas por *R. similis*.

Fuente: MSc. Alejandro Rodríguez

R. similis tiene la capacidad de sobrevivir en suelos que mantengan raíces, rizomas, plantas voluntarias y además en otros cultivos como café (Rubiaceae), caña de azúcar (Poaceae), pimienta (Piperaceae). La mayoría de las veces, la

ineficacia en la remoción de residuos infectados, constituye una de las principales causas de re-infestación en el establecimiento de nuevas siembras (Sánchez 2012; Guzmán 2011).

3.4.1 Ciclo de vida

El ciclo de vida de *R. similis* se completa en 20 a 25 días en los tejidos de la raíz y el cormo a un rango de temperatura de 24-32 °C (Sarah et al. 1996; Esquivel 2001). Los nematodos empiezan a alimentarse y reproducirse dentro de las cavidades de la corteza de la raíz; su población aumenta 10 veces en 45 días bajo condiciones favorables. Las hembras depositan de 4 a 5 huevos diarios en un período de quince días. Los huevos eclosionan de 8 a 10 días después y los estados juveniles requieren entre 10 y 13 días para completar su desarrollo (Kaplan 1994). En la medida que se desarrollen, las poblaciones de nematodos aumentan con gran rapidez (Cocom 2005).

3.4.2 Daño al cultivo de banano

El nematodo perfora la pared celular con su estilete e ingresa principalmente cerca a la cofia de las raíces, a lo largo de estas. Las hembras y todos los estados juveniles son infectivos, sin embargo, los machos no poseen estilete, por lo que no son infectivos (Sarah et al. 1996, Marín et al. 2002).

Se alimenta y reproduce en las células corticales de las raíces y del cormo (Marín et al. 2002). Tanto juveniles como adultos, viven en el parénquima cortical, donde se mueven activamente causando daño conforme se alimentan de las células vecinas. Las células son destruidas y el nematodo migra intra e intercelularmente en el cilindro cortical y los cormos, realizando lesiones que tienden a coalescer provocando una atrofia en el tejido radicular.

Las áreas rojizas (Figura 2) son características típicas de que las raíces están infectadas con todos los estados del nematodo; mientras que las áreas necróticas son el resultado de la invasión de microorganismos secundarios como hongos y bacterias (Marín et al. 2002).



Figura 2 Áreas rojizas causadas por la infestación de *R. similis*, raíces de banano.

Fuente: Luis Carlos Oses R.

Las pérdidas causadas por *R. similis* dependen, en gran medida, de la fertilidad del suelo. En condiciones extremas, donde los suelos son pobres y erosionados, las pérdidas acumulativas durante tres ciclos de producción, pueden alcanzar hasta 75%, debido a la reducción de peso del racimo y a la caída de las plantas. No obstante, en suelos ricos en materia orgánica o en suelos volcánicos, las pérdidas acumulativas no sobrepasan el 30 % (Sarah *et al.* 1996). En América Central (Costa Rica y Panamá) y en América del Sur (Colombia y Ecuador), las pérdidas causadas esencialmente por el desraizado de plantas (volcado) fluctúan entre 30- 50%, mientras que en Guatemala y Honduras las pérdidas rondan de 10 a 20% (Chaves 2007). El daño también depende de la agresividad de la población de *R. similis* presente, la cual varía mucho entre zonas de producción (Sarah *et al.* 1996).

3.5 Manejo integrado de nematodos

Los nematodos fitoparásitos son microorganismos del suelo que deben ser manejados con diferentes tácticas de control para disminuir sus poblaciones. Es

importante conocer su biología, ecología y epidemiología. Las principales tácticas que se utilizan son: el control químico, el control cultural y el control biológico.

3.5.1 Combate químico

Debido a que las variedades comerciales del subgrupo Cavendish son altamente susceptibles a los nematodos, en la actualidad, el control químico de nematodos es el método más común para reducir sus poblaciones (Meneses 2003). Además, no se cuenta con variedades resistentes (Araya 2003).

De acuerdo con Pocasangre *et al.* (2006), el manejo convencional de nematodos fitoparásitos en banano, se basa en dos a tres aplicaciones de nematicidas. El costo del control se encuentra entre USD 350 a 500 ha⁻¹ año⁻¹. Sin embargo estudios realizados por CORBANA (2011) indican que para Costa Rica, el combate químico de nematodos se realiza entre 3 y 4 ciclos de nematicidas. Este método de control es bien conocido por eliminar gran parte de la microfauna y mesofauna del suelo, como nematodos de vida libre y ácaros, que son agentes biológicos de control y participan en el reciclaje de nutrientes del suelo (Rodríguez *et al.* 2012). Por otra parte, estudios realizados por Zhang *et al.* (2014) en China, evidenciaron que el fluopyram, un ingrediente activo con efecto fungicida, pero que recientemente se ha registrado en Centroamérica como nematicida en formulación de suspensión concentrada para uso en banano, afectó significativamente la microbiota en el suelo, produciendo daños muy severos en su estructura comunal microbiana y en su diversidad funcional, hasta por un período de 90 días.

Los nematicidas utilizados en banano pertenecen a los grupos químicos organofosforados, carbamatos o benzamidas (Sarah *et al.* 1996). Las moléculas más utilizadas en las plantaciones bananeras en Costa Rica son terbufos, ethoprofos, cadusafos y fenamifos, todos organofosforados. Además del oxamil que pertenece al grupo químico de los carbamatos y el fluopyram que pertenece al grupo de los benzamidas. Según CORBANA (2011), el promedio de aplicación es de 8.81 kg ia (ingrediente activo) ha⁻¹ año⁻¹. Las formulaciones granuladas son

aplicadas de forma profiláctica y generalizada sobre la superficie del suelo, alrededor de la planta (Sarah *et al.* 1996). El oxamil (Vydate 24 SL), puede además ser inyectado en el pseudotallo (Morales 2006).

Dentro de los plaguicidas disponibles en el mercado, los nematicidas presentan como principal factor en contra, su alta toxicidad, aún mayor que la de los insecticidas, fungicidas y herbicidas, característica que los vuelve más susceptibles a ser prohibidos en la agricultura (Pocasangre *et al.* 2006). Un agravante para esta situación deriva del uso no racional e inadecuado de estas sustancias, pues esto en el mediano plazo, puede propiciar que los patógenos generen resistencia, obligando a incrementar dosis y frecuencias de aplicación, e incrementando el riesgo de contaminación ambiental (CORBANA 2011).

Otro factor que está en contra de los nematicidas es la biodegradación acelerada. Este proceso se puede definir como el incremento de la degradación del ingrediente activo del nematicida y/o sus metabolitos por medio de microorganismos específicos (Moens *et al.* 2003). Este efecto provoca una disminución en el control de nematodos.

Los microorganismos son capaces de crecer en un ambiente con el ingrediente activo como única fuente de carbono y energía. El fenómeno no solo se asocia a los nematicidas, sino también a los herbicidas, insecticidas y fungicidas, ya que algunos microorganismos pueden degradar aquellos que son químicamente relacionados en su composición y estructura (Araya 2003, Araya 2004). Estudios realizados por Moens *et al.* (2003) demuestran que un determinado nematicida pierde efectividad, sobre todo cuando es aplicado de forma repetitiva, debido a las alteraciones en las cadenas tróficas y a la degradación del producto a metabolitos no tóxicos.

Debido a la problemática asociada al uso de nematicidas, es necesario buscar alternativas no químicas, pero eficaces, para regular las poblaciones de nematodos. Dentro de estas, el uso de Agentes de Control Biológico (ACB) como

hongos y bacterias, se vislumbra como una necesidad imperativa para la industria bananera (Pocasangre et al. 2006).

3.5.2 Combate cultural

Alternativas como las prácticas culturales, pueden suprimir la presión ejercida por nematodos en forma significativa, permitiendo que aumente o se mantenga la producción de banano. Algunas de esas prácticas son utilizadas actualmente en producción intensiva de banano. Entre ellas se pueden mencionar: uso de material de siembra (vitroplantas) libre de nematodos, el barbecho, la inundación y la rotación con cultivos no hospedantes. Estas técnicas permiten además reducir la carga química con plaguicidas (Sánchez 2012; Guzmán 2011). Las poblaciones de nematodos pueden reducirse a niveles imperceptibles con sólo un año de barbecho. Se puede usar un cultivo no hospedero como *Chromolaena odorata* (Asteracea), el cual es muy efectivo en África (Sarah et al. 1996). Guzmán (2011), sugiere que este efecto se puede lograr simplemente manteniendo el lote libre de hospederos por un espacio de entre seis meses y dos años. Durante este período, todos los tejidos del plátano o el banano deben de ser eliminados para reducir las poblaciones de nematodos, ya que *R. similis* puede sobrevivir en ellos por seis meses.

La inundación del campo por un período de 6 ó 7 semanas puede ser muy efectiva para la reducción de las poblaciones de nematodos. Sin embargo, esto se podrá utilizar únicamente en sitios donde la topografía lo permita, ya que la inundación requiere terrenos bien nivelados y una fuente de agua permanente; debido a la geografía y diseño que generalmente presentan las fincas bananeras, esto se hace muy complejo (Sarah et al. 1996).

Otras prácticas agronómicas que permiten reducir el impacto de los nematodos son las resiembras con material sano, las prácticas que favorezcan la sanidad del cultivo y el vigor de las raíces, como la aplicación de mezclas de hongos y bacterias biorreguladoras, tales como *Paecilomyces lilacinus*, *Pasteuria penetrans*, *micorrizas arbusculares* (Guzmán 2011, Guzmán et al. 2012).

3.5.3 Combate biológico

El control biológico puede definirse como el uso de organismos benéficos (enemigos naturales) contra aquellos que causan daño (plagas) (Nicholls 2008). Actualmente el control biológico es una alternativa importante que se está utilizando para la reducción de plaguicidas sintéticos en muchos cultivos; por tanto, la implementación del combate biológico a través de microorganismos, es una opción atractiva (Ibarra et al. 2006). Este tipo de control natural regula las poblaciones de nematodos a través de diferentes mecanismos, tales como, parasitismo, depredación, competencia y antibiosis (Morales 2006).

El control biológico proporciona muchas ventajas a los productores sobre otras prácticas que se utilizan normalmente, como por ejemplo: costos de producción reducidos, debido a un menor uso de agroquímicos; un sistema productivo más equilibrado; y un incremento en la sostenibilidad productiva, debido a la incorporación de microfauna y microflora a los suelos. Asimismo, el agente controlador puede persistir en el ambiente por un largo tiempo y resurgir cuando la plaga aparezca nuevamente (Morales 2006).

Existen tres tipos de control biológico:

Control Biológico Clásico: que consiste en la introducción de un enemigo natural en un nuevo ambiente, con el fin de que se establezca de forma permanente y regule la plaga de manera sostenida en el tiempo. Estos agentes de control biológico (ACB) son específicos para el combate de un agente exótico que se establece como plaga. Esta necesidad surge debido a la ausencia de ACB para una plaga introducida que no cuenta con sus controladores endémicos (Van Driesche et al. 2007, Rodríguez et al. 2010, Fischbein 2012).

Control Biológico Aumentativo: cuyo principio es aumentar la población de enemigos naturales en el área afectada, y así obtener un efecto regulatorio. Este tipo de control biológico, aplica dos tácticas de liberación: la inundativa, que es la

liberación de un gran número de enemigos naturales, que resulta en una reducción rápida de la plaga; y la liberación inoculativa, que es la liberación de enemigos naturales de forma reducida o periódica, a efecto de establecerlos. Lo que se espera del empleo de este método, es que las poblaciones de la plaga se regulen de una forma más persistente (Fischbein 2012; Rodríguez et al. 2012).

Control Biológico Conservativo: consiste en la implementación de prácticas y estrategias para favorecer el establecimiento y la proliferación de organismos benéficos propios del lugar. Su meta es minimizar los factores que afectan perjudicialmente a las especies benéficas y reforzar aquellos que hacen de los campos agrícolas un hábitat adecuado para los enemigos naturales. (Lacey et al. 2001, Van Driesche et al. 2007, Rodríguez et al. 2012).

3.6 Combate biológico de nematodos mediante hongos y bacterias

La información sobre organismos antagónicos de nematodos es bastante sustancial y es de gran importancia para la economía de sistemas agrícolas. Se ha descrito la existencia de diferentes tipos de enemigos naturales, algunos altamente eficaces que logran limitar sus niveles poblacionales. Existe el conocimiento de la existencia de una microflora y microfauna en el suelo cuyas especies son antagonistas o reguladoras de las actividades de los nematodos. En la actualidad los grupos más importantes en el control biológico de nematodos son los hongos nematófagos y endofíticos, y las bacterias.

3.6.1 Utilización de hongos nematófagos

En la literatura se reportan hongos como *Arthrobotrys* sp y *Monacrosporium* sp, los cuales han desarrollado hifas con estructuras especializadas para atrapar nematodos. Los hongos nematófagos son microorganismos con la capacidad de atacar, matar y digerir nematodos (adultos, juveniles y huevos) (Piedra 2008).

Estudios realizados por Martinuz et al. (2010) reflejaron que los tratamientos con los hongos nematófagos *Arthrobotrys oligospora*, *A. botryospora*, *Dactylella brochophaga* y *Drechmeria coniospora*, tuvieron un mejor control de *R. similis* con respecto al testigo absoluto después de seis muestreos; al mismo tiempo, se logró demostrar que estos hongos igualaron los niveles de control alcanzado por el tratamiento químico.

También se ha descrito hongos que son parásitos obligados, como *Catenaria* spp, cuyas zoosporas se adhieren y penetran la cutícula; hongos endoparásitos con conidios adhesivos, como *Drechmeria coniospora* y *Harposporium* spp (Piedra 2008; Martinuz et al. 2010).

Paecilomyces lilacinus es un hongo ampliamente relacionado al control de nematodos de los géneros *Meloidogyne* y *Pratylenchus*, así como de especies como *Radopholus similis* y *Globodera pallida*. *P. lilacinus* parasita huevos, crece en su interior y mata el embrión reduciendo la eclosión; además, es capaz de invadir hembras maduras, logrando la destrucción de los ovarios. Las hifas de este hongo penetran la cutícula de los huevos, los cuales una vez invadidos, se ensanchan por la alteración de la permeabilidad de la pared y sufren una serie de cambios estructurales. Este hongo presenta como principal mecanismo de acción, el ataque en etapas sedentarias, en particular a los huevos de nematodos enquistados, produciendo leucinotoxinas, quitinasas, proteasas y ácido acético; además, compuestos relacionados con el proceso de infección (Romero 2003).

3.6.2 Utilización de hongos endófitos

Los hongos endófitos son definidos como microorganismos que pasan todo su ciclo de vida o parte de este, colonizando los tejidos de la planta hospedera de forma inter e intracelularmente, sin causar daño evidente (Sánchez et al. 2013). La colonización implica la habilidad por parte del hongo, de adherirse y reconocer la raíz, y además, de resistir el efecto de metabolitos tóxicos producidos por la planta en respuesta a la invasión (Barrios 2006). Zum Felde et al. (2003) reportan a

Fusarium oxysporum y a *Trichoderma atroviride*, como hongos endófitos que suprimen *R. similis* en las raíces del banano.

Estos hongos toman nutrientes de las raíces y protegen a su hospedero dándole más resistencia a la hora de enfrentar una infestación de nematodos, desempeñando un papel mutualista, induciendo al crecimiento de la planta, aumentando la tolerancia al estrés y produciendo metabolitos secundarios con amplia diversidad estructural, que le brindan protección y resistencia contra nematodos fitopatógenos (Sánchez 2013).

3.6.3 Utilización de Bacterias

Las bacterias son otro gran grupo de microorganismos que se utiliza en la actualidad para el control biológico de nematodos. Géneros como *Serratia* y *Pseudomonas*, por ejemplo, son ampliamente reconocidos por producir compuestos tóxicos a insectos, pero también a diversas especies de nematodos fitoparásitos (Rodríguez 1991). Se cita además con esta característica, a géneros como *Gluconobacter*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Azoarcus*, *Rhizobium*, *Azotobacter* *Bacillus*, *Actinomyces* y *Pasteuria spp*, algunos de ellos afectando a *R. similis* (Rodríguez 1991, Pérez y Chamorro 2012, Rodríguez 2014).

El modo de acción de las bacterias contra los nematodos es diverso, pudiéndose dar mediante el parasitismo, la producción de toxinas, enzimas o antibióticos, o mediante la interferencia de los nematodos hacia el reconocimiento de la planta huésped. Las bacterias pueden también ejercer la competencia por nutrientes o promover la resistencia sistémica en las plantas (Rodríguez 2014).

Las bacterias no parasíticas a su vez pueden dividirse en dos grupos: endofíticas y rizosféricas. El primer grupo (endofíticas) se caracterizan por ser microorganismos que se establecen en los tejidos internos de la epidermis, no provocan daños a las plantas y presentan un efecto mutualista (Ramírez 2010; Pérez y Chamorro 2012). Por el contrario, las bacterias rizosféricas son capaces de colonizar las raíces y el entorno rizosférico; y representan uno de los grupos microbianos más importantes de los suelos (Jaizme y Rodríguez 2008). Este

grupo además de actuar sobre nematodos, tiene un efecto de biorremediación en suelos de fincas agrícolas (Salgado et al. 2012).

Ejemplos de bacterias con diferentes modos de acción son: *Pasteuria penetrans*, que es un parasito verdadero, principalmente del género *Meloidogyne* spp; *Brevibacillus laterosporus* que se caracteriza por ser un parásito oportunista; las rizobacterias del género *Bacillus*, formadoras de proteínas *Cry* como *Bacillus thuringiensis* y *B. sphaericus*; existen además bacterias endofíticas y simbiotes como *Xenorhabdus* sp y *Photorhabdus* spp (Tian et al. 2007).

3.7 Género *Pasteuria* spp.

El género *Pasteuria* se describió por primera vez por Metchnikoff en 1888 como un parásito de *Daphnia*, un género de crustáceos planctónicos del orden Cladocera. En 1906 Cobb observó por primera vez la bacteria asociada al nematodo *Dorylaimus bulbiferous* (Oostendorp et al.1990). Son parásitos comunes de los nematodos fitoparásitos y también de una amplia variedad de nematodos que habitan el suelo. La lista más reciente de hospederos de este género registra 300 taxones de nematodos, en su mayoría miembros de las órdenes Tylenchida y Dorylaimida (Chen y Dickson 1998).

Basado en su amplia cantidad de huéspedes y de acuerdo con su ciclo de vida y morfología, existen tres especies nominales de *Pasteuria*, que son capaces de parasitar nematodos asociados a plantas. Estas tres especies de *Pausteria* son: *P. penetrans*, que es un parásito de *Meloidogyne* spp.; *Pasteuria thornei*, que es un parásito de *Pratylenchus* spp. y *Pasteuria nishizawae*, que es un parásito de *Heterodera* spp y *Globodera* spp (Chen y Dickson 1998).

3.7.1 *Pasteuria penetrans*

Pertenece al grupo de bacterias formadoras de endósporas; son patógenas de varios géneros de nematodos parasíticos de plantas, lo cual ha sido demostrado en ensayos a nivel de vivero (Channer et al. 1997). Según Chen y Dickson (1998) *P. penetrans* logró controlar bajo condiciones de vivero, nematodos como

Meloidogyne spp en cultivos de berenjena, garbanzo, pepino, uva, kiwi, maní, pimienta, centeno, soja, tabaco, tomate y trigo.

La naturaleza de la adhesión de las esporas de *P. penetrans* a la superficie de los juveniles de *Meloidogyne* (J₂), no ha sido completamente dilucidada, aun cuando numerosas investigaciones han estado enfocadas a explicar los procesos asociados a la unión inicial de las endósporas a sus respectivos hospedantes (Oostendorp et al. 1990).

3.7.2 Ciclo de vida *P. penetrans*

El ciclo de vida de la bacteria se completa entre los 18 y 20 días. Inicialmente, las endósporas presentes en el suelo se adhieren a la cutícula del nematodo (J₂) durante su migración hacia la planta. Cuando el nematodo entra en la raíz que infecta, las esporas continúan adheridas a su cutícula. La bacteria germina en el interior del nematodo hembra, y este se transforma más tarde en una especie de saco de esporas. En consecuencia, la hembra no puede reproducirse y muere al reventar bajo la presión de las esporas que se liberan nuevamente al suelo, reiniciándose así su ciclo de vida (Piedra 2008). La infección por la bacteria parece estar relacionada a la iniciación de la alimentación por el nematodo (Bird et al. 2003).

Los nematodos infectados continúan su desarrollo, pero microcolonias de la bacteria que proliferan, impiden a las hembras infectadas producir huevos.

Cada hembra infectada puede producir hasta dos millones de endósporas que son finalmente liberadas en el suelo (Bird et al. 2003). La figura 3 muestra el ciclo de vida de *P. penetrans*.

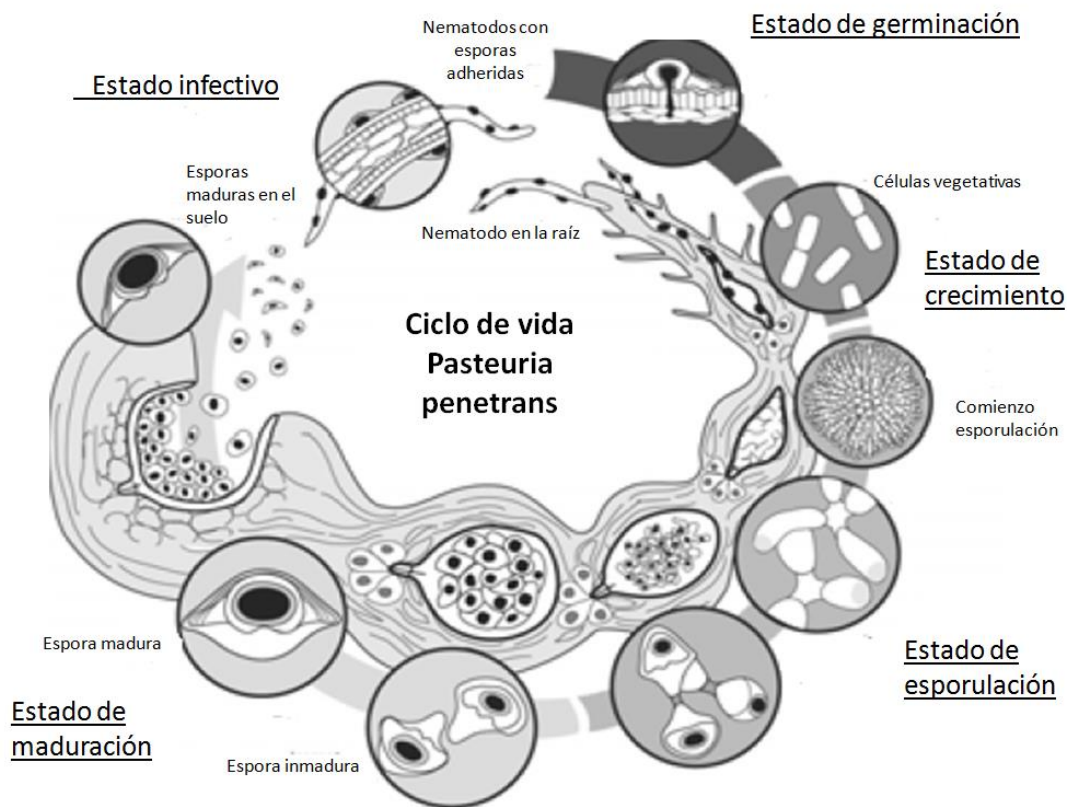


Figura 3. Ciclo de vida de Pasteuria penetrans.

Fuente: Modificado de Pasteuria Bioscience 2004.

3.7.3 Aspectos ecológicos de *P. penetrans*

La variabilidad de las poblaciones de *P. penetrans* es amplia y depende de las condiciones agroclimáticas, de la región geográfica y de la composición de la población de nematodos presente. Factores abióticos y bióticos están implicados en la actividad de *P. penetrans* para controlar a sus hospedantes (Gómez *et al.* 2010). Se describe a continuación, el efecto de los principales factores abióticos que inciden en la bacteria y su actividad antagónica a nematodos.

3.7.3.1 Temperatura

La temperatura es el factor más importante en las interacciones que ocurren entre *P. penetrans* y sus hospedantes; afecta la germinación de esporas y la adhesión a la cutícula del nematodo; además afecta la patogenicidad y el ciclo de vida de la bacteria en el pseudoceloma de los nematodos. La bacteria no produce esporas por debajo de 20°C, pero por encima de ese umbral, la producción de esporas es mucho más rápida que la producción de huevos por parte del nematodo (Gómez et al. 2010).

La adherencia al nematodo también es influenciada por la temperatura. Chand (1994), obtuvo una adherencia máxima de endósporas a 26°C. Stirling et al., citado por Chen (1996) observaron que la tasa de la adhesión de endósporas era el doble a 27°C, con respecto a 18°C. La fijación de endósporas en J2 aumentó conforme subió la temperatura. Ahmed et al., Hatz y Dickson, citado por Chen (1996) determinaron que el número máximo de endósporas de *P. penetrans* adheridas a J2 de *M. javanica*, se observó a 30 °C y por encima de esta temperatura, declino significativamente.

3.7.3.2 Suelo

La textura y estructura del suelo son factores de gran importancia, ya que actúan sobre el flujo y adhesión de las esporas. La mayoría de las veces, *P. penetrans* ha sido encontrada en los suelos de textura arenosa; también ha sido encontrada en otros tipos de suelos, muchos de ellos considerados supresores por la presencia de esta bacteria. Por lo tanto, no cabe dudas que la distribución y eficacia de *P. penetrans* varía no solamente de un tipo de suelo a otro, sino también en un mismo tipo de suelo. Algunas características físicas del suelo como la capacidad de retención del agua y la aireación en suelos areno-arcillosos, proporcionan una mayor infección a los juveniles y con ello, un mayor desarrollo de *P. penetrans* que en suelos arenosos (Dabiré y Mateille 2004, Gómez et al. 2010).

3.7.3.3 Humedad

La información existente acerca de la influencia de la humedad sobre la adhesión de las endósporas y el desarrollo de *P. penetrans* es muy escasa; sin embargo, se conoce que las endósporas son resistentes a la desecación. La actividad de los nematodos en el suelo se afecta en gran medida por las condiciones hídricas (Van Gundy 1985). Es posible que estas también tengan una influencia sobre el grado de adhesión de las esporas de *P. penetrans* a la cutícula de los nematodos. Por otro lado, algunos estudios sobre la humedad del suelo y la adhesión de las esporas, han producido resultados variables; por ejemplo, Dabiré y Mateille (2004) señalan que el porcentaje de esporas adheridas, fue menor cuando el suelo presentó una humedad por debajo del 10%, que cuando estuvo por encima del 25%.

3.7.3.4 Potencial de hidrógeno (pH)

El pH afecta la adhesión de las endósporas de *P. penetrans* a los nematodos. Estudios han demostrado que la adhesión de las endósporas es mayor a pH 9 que a pH más bajos; sin embargo, Davies et al. (1988) observaron que la adhesión de endósporas fue mayor en agua de grifo a pH 7 y menor en un pH 4 y 9; además demostraron que en agua destilada la adhesión fue menor en pH 7 y mayor en un pH de 4 y 9. Estudios realizados por Chand (1994) demostraron que una mayor adhesión de esporas (28,84 esporas / J2) a pH 7,6; sin embargo a pH más bajos, disminuyó considerablemente. Gómez et al. (2010), señalan que es difícil interpretar efectos del pH sobre *P. penetrans*, ya que el parasitismo no se ve perjudicado hasta en rangos de 4.5 a 8.5.

3.7.4 Producción comercial de *P. penetrans*

Históricamente ha habido dos factores que limitan el uso comercial de esta bacteria para el control de nematodos a escala comercial: por un lado, la carencia de un medio de cultivo universal que permita su escalamiento en masa de esporas; y por el otro, la alta especificidad que existe en la interacción bacteria-

huésped, lo que significa que las diferentes cepas de la bacteria, son capaces de infectar solo a un tipo específico de nematodo (Bird et al. 2003).

3.8 Identificación y detección de *P. penetrans* mediante técnicas moleculares (PCR)

Ante la complejidad que presenta *P. penetrans* para su identificación y detección por métodos convencionales, se han implementado técnicas moleculares como el PCR convencional y el PCR en tiempo real.

La técnica con PCR convencional se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa que es capaz de fabricar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente; esto permite obtener múltiples copias de un fragmento de ADN específico, incluso en presencia de millones de otras moléculas de ADN (Cortazar y Silva 2004).

Investigaciones realizadas por Duan et al. (2003) contribuyeron con el estudio del género *Pasteuria* obteniendo treinta nuevos clones del gen 16S rRNA, los cuales se obtuvieron directamente de muestras de suelo y nematodos, y sirvieron para la construcción de una extensa filogenia de este género.

Atibalentja et al. (2004) utilizando los iniciadores 27F y 440R, además de 440F y 1492R, demostró que con tan solo una hembra de *Meloidogyne* spp parasitada con *P. penetrans*, es suficiente para amplificación por medio de PCR. Por otra parte, Mohan et al. (2011) identificaron endósporas de *Pasteuria nishizawae* extraídas de dos diferentes nematodos, *Globodera pallida* y *Heterodera cajani*; para ello utilizaron dos pares de iniciadores: primero 39F y Pssp16Sr1, y luego Pssp16Sf9 y Pssp16Sr5. Del primer par de iniciadores se obtuvo un producto de 794 pares de bases y del segundo par de iniciadores, se obtuvo un producto de 662 pares de bases. Estos productos de PCR fueron clonados y secuenciados, y los datos se usaron para construir una secuencia consenso de 1430pb. El fragmento resultante presentó un 98.6% de similitud respecto a las endósporas de *P. nishizawae*, en las dos especies de nematodos en estudio.

Trotter y Bishop (2003) realizaron un análisis filogénico y un estudio de la naturaleza de *P. penetrans* para formar endósporas; en el estudio utilizaron PCR con los iniciadores (SpollAF2 y SpollAR1) y (SpollAF3 y PpSpollAR), todo esto basado en el gen spollA. Con el primer par de iniciadores, se identificó a *P. penetrans* y con el segundo par de iniciadores a *P. ramosa*. Se sabe que este gen es restringido exclusivamente a los géneros de bacterias formadoras de endósporas.

Para la detección de diferentes biotipos de *P. penetrans*, o incluso, de otras especies de *Pasteuria*, se ha utilizado PCR en tiempo real con gran cantidad de iniciadores, tales como gyrBF/R, yacLF/R, yjaYF/R, ctaCF/R, sigGF/R, ctpAF/R, hemNF/R, dnaEF/R, yvjBF/R (Nong et al. 2007, Mauchline et al. 2010). Schmidt *et al.* (2004), diseñaron un grupo de iniciadores específicos: SigEF/R, SpollABF/R y atpFF/R. El primer par corresponde a una región del factor sigma E que interviene en el proceso y maduración de la pre-esporulación de la célula principal, el cual está codificado por el gen sigE y se sintetiza como un precursor inactivo, pro- σ E; este precursor interviene en el ensamblaje y liberación de la spora (Straigier *et al.* 1988). El segundo par de iniciadores corresponde a la subunidad spollAB de una proteína involucrada también en el proceso esporulación que determina factores esporulantes altamente conservados (Schmidt *et al.* 2008 y Arcuri *et al.* 2000). El último par de iniciadores atpF, es una subunidad de la atp sintasa del biotipo P20 (Cano y González 2011).

Además, otras investigaciones relacionadas a la filogenia de *P. penetrans*, han comprobado que éste microorganismo ha evolucionado significativamente a partir del género *Bacillus* y que pudo haberse generado de un colaborador de bacterias simbióticas de los nematodos (Charles et al. 2005).

4. Materiales y métodos

4.1 Ubicación espacial y temporal

El experimento se realizó en las instalaciones del Centro de Control Biológico y Biología Molecular y en el Laboratorio de Nematología, pertenecientes a la Dirección de Investigaciones Agrícolas, de la Corporación Bananera Nacional (CORBANA). Ambos sitios se ubican en La Rita de Pococí, provincia de Limón, a una altitud de 159 msnm, en una zona de vida caracterizada como Bosque Tropical muy Húmedo. Su ubicación geográfica es 10° 16.116´ latitud Norte y 083° 46.517´ longitud Oeste.

4.2 Sitios de recolecta de las muestras

La prospección de *Pasteuria penetrans* se realizó en la región caribeña de Costa Rica, entre los meses de enero y octubre del año 2014. Para ello se tomó muestras de suelo rizosférico, suelo extra rizosférico y raíz sana de banano, de 5 fincas bananeras comerciales, dos de ellas reportando la presencia de suelos supresores a *R. similis*. El muestreo incluyó además sitios aledaños a las fincas como bosques, tacotales y áreas en barbecho.

A continuación se describe la ubicación y características principales de las fincas visitadas (Fig. 4):

Cartagena: Ubicada en el cantón de Guácimo, provincia de Limón, a una altitud de 46 m.s.n.m; su ubicación geográfica es de 10° 15' 49" latitud Norte y 83° 37' 47" longitud Oeste, en una zona de vida caracterizada como Bosque Tropical muy Húmedo.

Duacaré 2: Ubicada en el cantón de Guácimo, provincia de Limón, a una altitud de 36 m.s.n.m, su ubicación geográfica es de 10° 20' 56" latitud Norte y 83° 36' 51" longitud Oeste, en una zona de vida caracterizada como Bosque Tropical muy Húmedo.

La Rebusca: Ubicada en el cantón de Sarapiquí, provincia de Heredia, a una altitud de 44 m.s.n.m, su ubicación geográfica es de 10° 28' 30" latitud Norte y 83° 59' 54" longitud Oeste, en una zona de vida caracterizada como Bosque Tropical muy Húmedo.

Platanera Río Sixaola: Ubicada en el cantón de Talamanca, provincia de Limón a una altitud de 38 m.s.n.m, su ubicación geográfica es de 9° 37' 13" latitud Norte y 82° 49' 41" longitud Oeste, en una zona de vida caracterizada como Bosque Tropical Húmedo.

Compañía Internacional de Banano S.A. (CIBSA), Finca San Pablo: Ubicada en el cantón de Siquirres, provincia de Limón a una altitud de 18 m.s.n.m, su ubicación geográfica es de 10° 6' 50" latitud Norte y 83° 23' 07" longitud Oeste, en una zona de vida caracterizada como Bosque Tropical Húmedo.

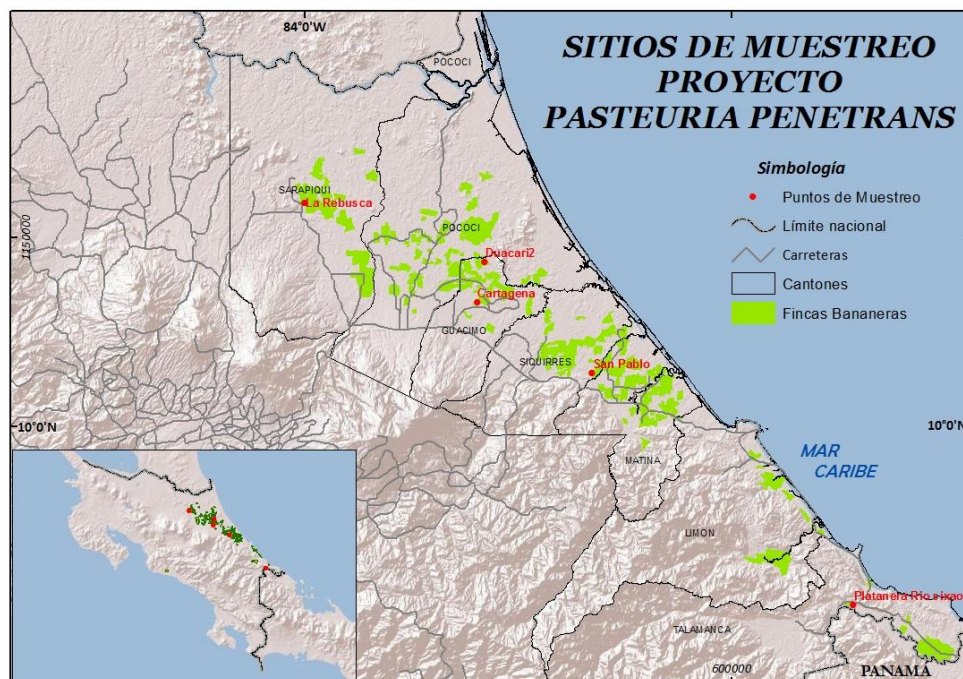


Figura 4. Ubicación geográfica de las fincas bananeras muestreadas.

Fuente: CORBANA

4.3 Toma de muestras

En cada finca se seleccionaron los cables a muestrear. Previamente de la selección, se realizó una investigación para determinar cables que hayan presentado alguna forma de supresión a *R. similis* o conteos bajos de este nematodo.

La muestra que se obtuvo de cada cable, estuvo compuesta por 7 submuestras; distribuidas en forma aleatoria. Se seleccionaron plantas próximas a florecer o recién florecidas (Figura 5a), esto con el objetivo de coincidir con el periodo de renovación del sistema radical y asegurar la obtención de suficiente raíz funcional en cada muestra (Quénéhervé 2009). La cantidad de muestras colectadas en cada finca se describe de la siguiente manera:

- Finca Cartagena: 4 muestras de raíz, 8 muestras de suelo.
- Finca Duacará 2: 5 Muestras de raíz y 10 de suelo.
- Finca Platanera: 8 muestras de raíz y 16 muestras de suelo.
- Finca San Pablo: 6 muestras de raíz y 12 muestras de suelo.
- Finca Rebusca: 5 muestras de raíz y 10 muestras de suelo.

La extracción de las sub muestras, se realizó frente al hijo de sucesión, a no más de 10 cm del pseudotallo. Para ello con la ayuda de un palín, se realizó un hoyo con una dimensión de 30 x 30 x 30 cm (27.000 cm³) (figura 5b), extrayéndose la raíz funcional, el suelo rizosférico (capa de suelo adherido a la raíz no mayor 2.mm de espesor) y el suelo extrarizosférico (figura 5c).

Para la extracción de la muestra final de raíz y suelo rizosférico por finca, los dos componentes de las 7 submuestras, se agitaron vigorosamente dentro de una bolsa plástica, a efecto de separar el suelo de la raíz. De cada componente se tomó una muestra final de aproximadamente 100 g.

Para tomar la muestra de suelo extrarizosférico, todo el volumen de suelo recolectado, fue homogenizado y posteriormente cuarteado para obtener un volumen final de muestra de 1000 g.

Las muestras fueron colocadas en bolsas plásticas debidamente rotuladas con la ubicación geográfica (georeferenciada mediante GPS marca Garmin) y con la ubicación en cuanto a cable y otras señas útiles para ubicar el sitio del cual fueron extraídas.

Finalmente, las muestras fueron colocadas dentro de una hielera para evitar su exposición a la radiación solar y a altas temperaturas, y fueron llevadas y procesadas en laboratorio de Control Biológico.



Figura 5. Muestreo de suelo y raíz a) Planta en floración o próxima a florecer, b) Hoyo frente al hijo de sucesión, c) Muestra de suelo y raíz.

Fuente: Luis Carlos Oses R.

4.4 Caracterización de condiciones edáficas y agroecológicas existentes de cada punto de muestreo

Con el objetivo de determinar un posible efecto de las condiciones agroecológicas y del manejo agronómico, sobre la presencia/ausencia de *P. penetrans*, se procedió a estudiar en cada punto de muestreo los siguientes aspectos: contenido de macro y micro nutrientes, pH, materia orgánica y textura del suelo; población de

nematodos, porcentaje de raíz funcional y no funcional; edad de la plantación, el cultivar, programa de fertilización, aplicación de abonos orgánicos y de agentes de control biológico. Los análisis químicos y físicos del suelo, así como los análisis nematológicos y de raíz funcional, fueron realizados en los laboratorios de Análisis Químico y Nematológico de CORBANA. Los registros de plantación y de manejo de cultivo fueron aportados por el Departamento de Asistencia Técnica de CORBANA y/o por personal de las fincas visitadas.

4.5 Análisis nematológico de raíz

Para la extracción de nematodos en raíces de banano, fue primordial garantizar que al menos los lugares a muestrear estuvieran libres de aplicación de nematicidas por 90 días; esto se corroboró con la información brindada por las fincas bananeras.

La extracción de los nematodos a partir de la raíz fue realizada en el laboratorio de nematología de la Corporación Bananera Nacional (CORBANA), siguiendo una modificación del método de Taylor y Loegering 1979 descrito por Araya (1999), el cual es muy utilizado en Centroamérica. La identificación de los géneros de nematodos presente, fue realizada con base en características morfológicas típicas de cada una de ellas.

A partir de cada muestra de raíz que se obtuvo en cada cable, se seleccionó únicamente la raíz funcional; es decir, raíz sana, sin daños y que mostrara un color blanco cremoso. Posteriormente, la raíz funcional fue seccionada transversalmente en trozos de 2-3 cm de longitud. A continuación, 25 g del material radicular seleccionado, fue vertido en una licuadora comercial, la cual se aforó a 150 ml con agua destilada. Se procedió a licuar la muestra a baja velocidad por 10 segundos y luego a alta velocidad por 5 segundos.

El contenido se tamizó en un juego de cribas: la primera de 60 μm , la segunda de 140 μm y la tercera de 500 μm . Se realizó un lavado de las raíces maceradas para incrementar la recuperación de los nematodos del tejido vegetal resultante. Los nematodos fueron colectados en cribas de 500 μm y transferidos a matraces con

capacidad volumétrica de 500 ml y se almacenaron bajo condiciones de laboratorio.

Para identificar y cuantificar la población de nematodos se tomaron alícuotas de 2 ml después de homogenizar la suspensión y se transfirieron a microcámaras de conteo. Se realizaron dos conteos de nematodos por alícuota en un microscopio invertido Welman a 40x de poder. A partir de los nematodos cuantificados por alícuota, se estimó la cantidad total presente en 25 g de raíz funcional, extrapolando para el volumen total.

Una vez realizado el conteo de nematodos se procedió a sacar el promedio de nematodos por género de cada área muestreadas en las fincas.

4.6 Detección e identificación molecular de la bacteria *P. penetrans* en muestras de raíz y suelo provenientes de fincas bananeras

La detección e identificación de *P. penetrans* presente en las muestras de suelo y de raíz por medio de métodos moleculares, fue realizada en el laboratorio de Biología Molecular de la Corporación Bananera Nacional (CORBANA), utilizando para ello las metodologías establecidas por CORBANA, según se detalla a continuación.

4.6.1 Extracción de ácidos nucleicos totales de *P. penetrans* a partir de muestras de raíz y suelo de plantas de banano

Para la extracción de los ácidos nucleídos totales se pesó 5 g de cada tipo de suelo (rizosférico y extrarizosférico) y 2,5 g de raíz. El material se transfirió a un macerador marca RETSCH MM400 en cuyo cilindro metálico se adicionó buffer extractor y un balín. Se procedió a macerar la muestra a una frecuencia de 26 vibraciones por segundo, durante 3 min; luego se transfirió a un tubo de 50 ml donde se agregó β -mercaptoethanol. A continuación se incubó por 20 minutos a

65°C mezclando en el vórtex cada 5 minutos y posteriormente, se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos.

Al finalizar la centrifugación se extrajo 1ml del líquido sobrenadante y se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 ml al cual se le adicionó Proteinasa K, RNase (20 µg/ml) y Lysozima (20mg/ml) dentro de una cámara extractora de gases; posterior a esto, se le aplicó una fuerte agitación mediante vórtex.

Seguidamente, la muestra se incubó por 30 minutos a 37°C y luego de finalizada la incubación, se agregó una punta de espátula de carbón activado. Seguidamente se realizó una segunda incubación a 65°C por 10 minutos, mezclando mediante vortex cada 5 minutos. Al finalizar la incubación, se agregó fenol, cloroformo e isoamyl alcohol en proporción 25:24:1; esto se mezcló utilizando el vórtex y posteriormente, se incubó por 2 minutos en el freezer a -20°C.

A continuación, las muestras se centrifugaron a 10.000 rpm y el sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf, al cual se le agregó fenol, cloroformo e isoamyl alcohol; seguidamente, las muestras se centrifugaron y el sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo eppendorf, al cual se le agregó PEG 30% y solución NaCl 5M. Las muestras se agitaron suavemente y luego se dejaron precipitar toda la noche.

Al finalizar el periodo nocturno, se centrifugó a 13000 rpm por 10 minutos. Finalmente se decantó el sobrenadante, se le agregó 200 µl de etanol al 70% y se centrifugó nuevamente a 13000 rpm por 5 minutos; se decantó el sobrenadante dejando los tubos invertidos sobre papel toalla por unas 3 horas a temperatura ambiente. Una vez finalizado el secado, se volvió a suspender según el tamaño del botón en (50, 100, 150 y 200 µL) de H₂O destilada, filtrada y esterilizada. Finalmente, las muestras se incubaron a 37°C por 10 minutos y se almacenaron a 4°C.

4.6.2 PCR para la detección de *P. penetrans* en raíz y suelo

La amplificación de varias regiones del genoma de *P. penetrans* (ver sección 3.8) se hizo por medio de PCR con iniciadores específicos descritos por Schmidt et al 2004: SigEF/R (F-CCACGTATGCTTCGAGATGTA, R-CCCCCTCCCAAACCAAAAC), SpoIIABF/R (F-TCGTGTTTCTGTGGAGATA, R-AATTCACAACGGCTACATTCC) y atpFF/R (F-GGTGTCGAAAATGATGGAGG, R-ACGTTTGCTCGGCTCTCTG). La reacción se realizó por separado para cada par de iniciadores a un volumen final de 25µl, que se desglosa de la siguiente manera: 11.25µl agua ultrapura, 5µl de Buffer (5X), 3µl MgCl₂ (25mM), 2.5µl de dNTPs (2.5mM), 1µl de primer Forward (10uM), 1µl primer Reverse (10uM), 0.25 µl Taq polimerasa y 1 µl de ADN (20ng/ul). Se utilizaron las siguientes condiciones térmicas: una etapa inicial de desnaturalización a 95°C por 1 minuto, seguido de 35 ciclos a 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos y 72°C por 40 segundos y una etapa de extensión final a 72°C por 10 minutos. Los productos de PCR fueron analizados en un gel de agarosa al 1% y visualizados mediante Gel Red (Biotium) y un transiluminador Uvitec.

4.6.3 Comprobación de la presencia de *Pasteuria penetrans* en sitios de muestreo por medio de muestras de raíz y suelo de plantas de banano.

Una vez identificadas, por medio de análisis moleculares, las fincas que presentaron resultados positivos a la presencia de *Pasteuria penetrans*, se procedió a hacer un segundo muestreo de la misma forma como se describe en la sección 4.3. Para este caso, De cada finca que dio resultados positivos a la presencia de la bacteria, se tomaron catorce muestras de raíz y doce muestras de suelo. Esto para comprobar la presencia/ausencia de la bacteria en los sitios donde fue recolectada las muestras de raíz y suelo. Se procedió a realizar nuevamente la extracción de ácidos nucleicos de la bacteria, en raíz y suelo

utilizando la metodología descrita en la sección 4.6.1. Posterior a esto se realizó el PCR de la misma forma a la sección 4.6.2.

4.7 Producción y extracción de *P. penetrans* utilizando plantas de tomate infectadas con *Meloidogyne* sp.

La reproducción de *P. penetrans* se realizó en el vivero del Laboratorio de Control Biológico de la Corporación Bananera Nacional (CORBANA), utilizando plantas de tomate de la variedad JR, infectadas con *Meloidogyne* sp, de acuerdo con la metodología descrita por Castro et al. 2011. El procedimiento se describe a continuación.

Del sitio preciso en donde se detectó molecularmente *P. penetrans* y mediante análisis nematológico la presencia del nematodo *Meloidogyne* sp., se extrajo 50 kg de suelo entre los 0 y 30 cm de profundidad. El suelo fue transportado en un saco dentro de una hielera debidamente rotulado. Dicho suelo se utilizó para llenar 25 potes negros, de 1,8 L de capacidad, con aproximadamente 2 kg de suelo cada uno. En cada recipiente se sembró una planta de tomate variedad JR, con 40 días de germinadas.

Luego de la siembra de las plantas se dio un lapso de tiempo de 2 meses para asegurar la colonización de la raíz por *Meloidogyne* sp y por ende, la reproducción de *P. penetrans* en los nematodos. Al finalizar este período y para confirmar la presencia de *P. penetrans*, las muestras de raíz de tomate con nódulos típicos producidos por *Meloidogyne* sp., fueron analizadas en el laboratorio de Biología Molecular de CORBANA. Para esto se siguió el protocolo de extracción de ácidos nucleicos totales de *P. penetrans* a partir de muestras de suelo y raíz (véase punto 4.6.1).

La figura 6 resume el procedimiento del aislamiento y multiplicación de *Pasteuria penetrans* utilizando plantas de tomate con suelo no estéril infectadas con *Meloidogyne* sp.

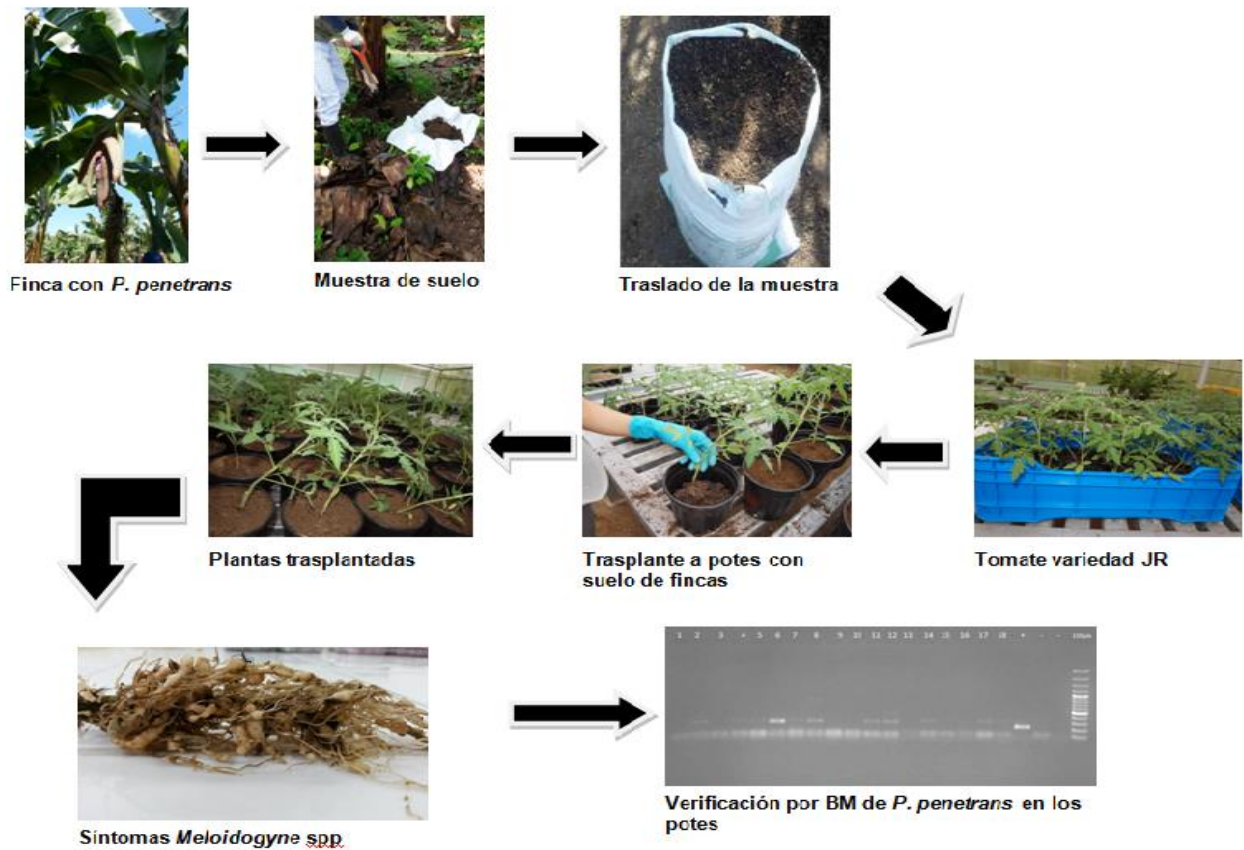


Figura 6. Procedimiento utilizado para el aislamiento y multiplicación de *P. penetrans* utilizando plantas de tomate (variedad JR).

4.7.1 Extracción de ácidos nucleicos totales de *P. penetrans* a partir de muestras raíz de plantas de Tomate variedad JR

Para la extracción de ácidos nucleicos totales de *P. penetrans* a partir de muestras de raíz de raíces de plantas de tomate se utilizó la misma metodología anterior (Ver sección 4.6.1). La extracción de ADN de la bacteria en las raíces de plantas de tomate, se realizó para determinar cuáles plantas contenían *P. penetrans*.

4.7.2 Extracción de ácidos nucleicos totales de *P. penetrans* a partir de nematodos (*Meloidogyne* sp) extraídos de plantas de tomate

Se colocó cada muestra con aproximadamente 20 nematodos extraídos de las muestras de raíz, en cada tubo eppendorf, se agregó 500µl buffer extractor; posteriormente se congelaron a -20°C por una hora. Después de congelar los nematodos se procedió a macerarlos con un pistilo plástico estéril durante 10 segundos para facilitar la extracción del ADN.

Posteriormente en el macerador de muestras, se le colocó 2 balines al tubo de 1.5ml y se procedió a macerar a una frecuencia de 27/s por 5 minutos. Se siguió el mismo protocolo anteriormente descrito (sección 4.6.1). Se realizó la extracción de ácidos nucleicos de 18 muestras.

4.7.3 PCR para la detección de *P. penetrans* en raíz de plantas de tomate y nematodos (*Meloidogyne* sp)

Para la amplificación de varias regiones del genoma de *P. penetrans* en plantas de tomate y nematodos se siguió la misma metodología descrita en la sección 4.6.2.

4.8 Extracción de endósporas y elaboración de la suspensión madre de *P. penetrans* a partir de *Meloidogyne* sp extraídos de plantas de tomate.

Una vez identificados por medio de técnicas moleculares (PCR) los potes que contenían la presencia de la bacteria, se procedió a la elaboración de una suspensión madre (SM) de endósporas de *P. penetrans*, cuyo procedimiento se explica a continuación.

En el invernadero se tomó una muestra de 25g de raíz por planta de tomate con nódulos y se depositó en pequeñas bolsas plásticas debidamente rotuladas. Las muestras fueron llevadas al Laboratorio de Control Biológico donde se procedió a lavarlas con agua destilada estéril.

Luego del lavado se extrajeron hembras de *Meloidogyne* sp.; para ello, en un mortero estéril con 15 ml de agua destilada estéril, se trituraron las raíces durante 2 minutos para garantizar la mayor extracción de las hembras. El contenido del mortero se tamizó en cribas de 60, 140 y 500 mesh utilizando agua destilada. Todos los nematodos retenidos en la criba de 500µm, fueron transferidos a matraces con agua destilada estéril con capacidad volumétrica de 500 ml. Posteriormente, 3 ml de la suspensión con hembras se depositó en una cámara de conteo. Se procedió a recolectar las hembras adultas de *Meloidogyne* sp., lo cual se repitió hasta agotar la suspensión. Con ayuda de un microscopio marca Olympus bx51tf y una pipeta eppendorf de 10 µl, se capturaron todas las hembras de *Meloidogyne* sp., presentes en la muestra y se depositaron en 4 tubos eppendorf de 1.5 ml, cada uno con un mililitro de solución salina (NaCl) al 0.9% (p/v) (Figura 7).

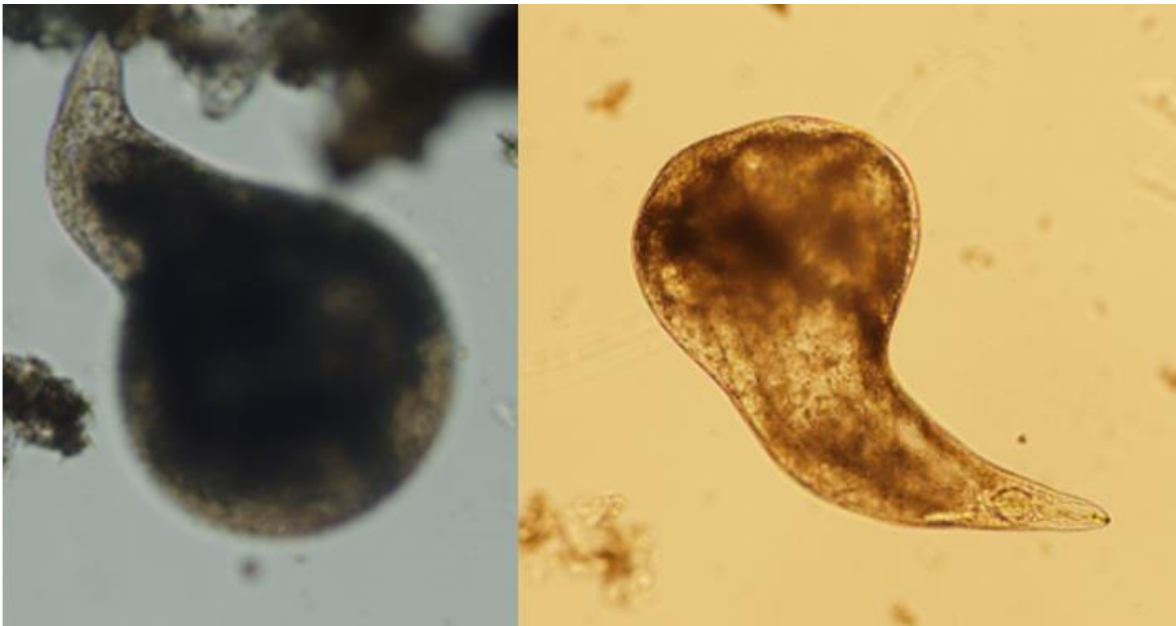


Figura 7. Hembras adultas de *Meloidogyne* sp.

Fuente: Luis Carlos Oses R.

Posteriormente los tubos se centrifugaron por 10 segundos a 10 rpm, para evitar el esparcimiento de las hembras. Después del paso anterior se unificaron los contenidos de los 4 tubos eppendorf para obtener un volumen total final de 4ml.

Para triturar a las hembras y extraer las endósporas de su interior, se utilizó un pistilo plástico estéril. La presencia de endósporas típicas de *P. penetrans* fue comprobada mediante su observación con un microscopio marca Olympus bx51tf a 40x de poder.

Para determinar la concentración o número de endósporas de *P. penetrans* en la solución acuosa, se utilizó la cámara de Neubauer marca Marienfeld, de 0,1 mm de profundidad y de 0.0025mm² de superficie de cada cuadrante menor. Se determinó el volumen total de la solución y la cantidad total de endosporas por mililitro.

Finalmente se procedió a cuantificar la concentración de la SM y a calcular la totalidad de endosporas presentes en los 4 ml.

4.9 Diseño experimental

Para determinar el efecto de *P. penetrans* sobre *R. similis*, bajo condiciones de laboratorio, se utilizó como referencia la metodología establecida por CORBANA, descrita por Rodríguez (2014), en la cual se establece la utilización de platos multipozo. Los bioensayos con *R. silimis* y *Meloidogyne* sp., se realizaron de forma simultánea.

Se utilizaron dos platos multipozo de veinticuatro pozos cada uno, uno para el tratamiento de endósporas con *R. similis* y el otro para el tratamiento de endósporas con *Meloidogyne* sp. De cada plato, 12 pozos correspondieron a suspensiones del nematodo tratadas con *P. penetrans* y 12 como testigo (solo con agua destilada estéril más nematodo). Se utilizaron entonces 12 repeticiones distribuidas completamente al azar dentro de los 24 pozos de cada plato. La cantidad de endosporas aplicada en cada pozo se calculó en $8,67 \times 10^4$.

4.9.1 Inoculo de nematodos utilizados en la evaluación *in vitro* con *P. penetrans*

Las hembras de *Meloidogyne* sp., y de *R. similis* que se utilizaron para la evaluación *in vitro* con *P. penetrans* fueron extraídas de inoculos pertenecientes al laboratorio de nematología. *Meloidogyne* sp J2, fue extraído de raíces de plantas de tomate variedad JR y *R. similis* fue obtenido de discos de zanahoria del laboratorio de nematología, Los inóculos fueron almacenados en condiciones de oscuridad a una temperatura de 26°C.

4.9.2 Aplicación de los tratamientos de *P. penetrans* sobre los nematodos *Radopholus similis* y *Meloidogyne* sp

Bajo condiciones de asepsia dentro de una cámara de flujo laminar, con la ayuda de una pipeta eppendorf de un ml de capacidad, se depositó en cada pozo correspondiente a cada bioensayo, un volumen de 210 µl de la SM de *Meloidogyne* sp y 537 µl de la SM de *R. similis*; ambas alícuotas contenían en promedio 24 nematodos.

A cada pozo se le adicionó 0.17 ml de SM de *P. penetrans* que contenía en promedio 8.67×10^4 endósporas (ver sección 4.8), el volumen final en cada pozo se ajustó a 2 ml con agua destilada estéril (ADE). Bajo esas condiciones, la concentración de nematodos en cada pozo se estableció en 12/ml; mientras que la concentración de endósporas en 4.35×10^4 /ml. Finalmente los platos se mantuvieron dentro de un incubador marca Hotech Mod. 624HD, a una temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ en condiciones de oscuridad durante 120 horas.

4.9.3 Evaluación *in vitro* del efecto de *P. penetrans* sobre los nematodos *Radopholus similis*

Los platos se incubaron en condiciones de oscuridad a una temperatura de 26°C. Las evaluaciones se realizaron a las 72 y 120 horas para cuantificar el parasitismo y muerte de los nematodos después de inoculados.

4.9.4 Variables a evaluar

Las variables evaluadas fueron: porcentaje de nematodos con al menos una endósporas adherida; y porcentaje de mortalidad de nematodos a las 72 y 120 horas de exposición al tratamiento. La verificación de las variables se realizó mediante un microscopio invertido CK2.

5. Análisis de los datos

Los resultados fueron evaluados con el programa SAS versión 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Se realizó el test exacto de Fisher que es indicada para realizar evaluaciones con muestras de pequeño tamaño.

6. Resultados

6.1 Caracterización de condiciones edáficas, ecológicas y de manejo agronómico existentes de cada punto de muestreo

El cuadro 4 muestra las variedades de banano sembradas en los sitios de muestreo según la finca visitada; como se puede observar, el muestreo permitió valorar la presencia de la bacteria en 6 de los cultivares más utilizados del subgrupo Cavendish, y además, incluyó a Gros Michel, dada su importancia para el mercado nacional. Todas las muestras analizadas provenían de plantaciones de más de 3 años de edad.

Cuadro 4. Cultivares de banano analizados según la finca visitada.

Finca	Variedad
Cartagena	Gigante colombiano, Gran Enano, Jaffa
Rebusca	Gran Enano Oaxaco
Duacaré 2	Valery
Platanera	Gros Michel (C48) y Williams
San Pablo	Valery

El cuadro 5, muestra el manejo de cada finca visitada en cuanto al riego y número de ciclos de fertilización química. Como se observa, únicamente finca Platanera Río Sixaola utiliza riego debido a que la región en la cual se ubica, presenta un régimen de precipitaciones menor en comparación con las regiones en donde se ubican las demás fincas muestreadas. En cuanto a la intensidad de fertilización, el cuadro 6 muestra que ésta es variable dependiendo de cada finca y estados fenológicos de la planta, pudiendo ser de uno o dos ciclos mensuales.

Cuadro 5. Aplicación de riego e intensidad (ciclos) de aplicación de fertilizantes en las fincas muestreadas.

Finca	Uso de riego	N° de ciclos al mes de fertilización química
Cartagena	No se utiliza	1
Rebusca	No se utiliza	2
Duacarí 2	No se utiliza	1
Platanera Río Sixaola	Sí, se hacen riegos 3 veces por mes	1
San Pablo	No se utiliza	1 vez cada 3 semanas

En cuanto al manejo alternativo de plagas, enfermedades y fertilización, el cuadro 6 muestra que la mayoría de las fincas incluidas en el estudio implementan, bajo distintos niveles de intensidad, sistemas complementarios que son amigables con el ambiente y que contribuyen además a conservar la salud y calidad del suelo; entre estos se citan insumos biológicos a base de hongos y bacterias para el combate de insectos, nematodos y patógenos; la aplicación de biofermentos (bioles), abonos orgánicos, y la conservación de coberturas vegetales. La finca Duacarí 2 a diferencia de las otras fincas, no utiliza agentes de control biológico ni coberturas vegetales; además, aplica abonos orgánicos a baja intensidad.

Cuadro 6. Manejo alternativo de plagas, enfermedades y fertilización mediante alternativas amigables con el ambiente.

Finca	Agentes de Control Biológico			Biofermentos y abonos orgánicos			Coberturas vegetales	
	Uso	Tipo	Intensidad	Uso	Tipo	Intensidad	Uso	Cantidad

Cartagena	Sí	Hongos, bacterias	Alta	Sí	Bioles, Abonos orgánicos	Alta	Sí	Alta
Rebusca	No	-	-	Sí	Bioles, Abonos orgánicos	Alta	Sí	Media
Duacaré 2	No	-	-	Sí	Abonos orgánicos	Baja	No	-
Platanera Rio Sixaola	Sí	Hongos, bacterias	Alta	Sí	Abonos orgánicos	Alta	Sí	Alta
San Pablo	Sí	Hongos, bacterias	Alta	Sí	Bioles, Abonos orgánicos	Alta	Sí	Alta

En cuanto a factores edáficos como de textura, pH y % materia orgánica, el cuadro 7 muestra que en finca Cartagena predomina las texturas arenosas, mientras que en fincas como Rebusca, Duacaré 2, San Pablo y Platanera Rio Sixaola, se encuentran otras texturas como arcilla y limo. El pH en todas las fincas estudiadas, presenta un rango a que va de 5.5 a 6.5, para alcanzar las mayores producciones en banano (CORBANA 2010); sin embargo en finca Platanera Rio Sixaola ese rango no se cumple debido a que hay valores de pH ácidos como 4.91. El porcentaje de materia orgánica varía entre las fincas de acuerdo a los análisis químicos de suelo realizados (Anexo 2); el valor más alto lo presentó finca Cartagena.

Cuadro 7. Condiciones edáficas de las fincas muestreadas.

Finca	Texturas	Rango de pH	Materia Orgánica (%)
Cartagena	Franco arenoso Arenoso Franco	5.25 - 6.30	3.4-11.6
Rebusca	Franco Arcilloso Franco	5.40 - 6.75	2.7 - 4.7
Duacaré 2	Franco arcillo arenoso Franco arcilloso	5.23-5.64	3.2-6.0
Platanera	Franco limoso Franco Franco arenosos Arenoso	4.91 - 6.71	1.4 - 3.7

San Pablo	Franco Franco arenoso Franco arcillo arenoso	5.60 - 6.28	1.5 - 4.4
-----------	--	-------------	-----------

6.2 Análisis nematológico

El cuadro 8 muestra el promedio de nematodos en 100 g de raíz encontrado en las plantas muestreadas en las diferentes fincas. En general, se observa a *R. similis* como el nematodo de mayor predominancia, seguido por *Helicotylenchus* sp, *Meloidogyne* sp y *Pratylenchus* sp., respectivamente. Sin embargo, en los cables 24 y 25 de finca Cartagena (Anexo 1), se observa que *R. similis* no está presente y la predominancia es de *Meloidogyne* sp.

De acuerdo al total de nematodos, finca Rebusca presenta los niveles más altos de población (40160) y Cartagena los más bajos (12900). Es importante indicar que CORBANA recomienda la aplicación de nematicidas cuando la población de *R. similis* es igual o mayor a 8000 individuos/100g de raíz.

Cuadro 8. Número promedio de nematodos presentes en 100 g de raíz, según área muestreada de cada finca.

Finca	Promedio de nematodos/100 g de raíz funcional				Nematodos totales
	<i>R. similis</i>	<i>Meloidogyne</i> sp.	<i>Pratylenchus</i> sp.	<i>Helicotylenchus</i> sp.	
Cartagena (n=4)	5.400	1.600	0	5.900	12.900
Duacari 2 (n=5)	13.760	320	1.040	5.080	20.200
Platanera (n=8)	8500	150	0	4.900	13.550
San Pablo (n=6)	27.433	133	0	1.600	29.167
Rebusca (n=5)	34.000	0	320	5.840	40.160

6.3 Detección de *P. penetrans* en muestras de raíz de banano, analizadas por técnicas moleculares

Pasteuria penetrans únicamente se detectó en finca Cartagena (cuadro 9); específicamente en los cables 24 y 25, que coincidentemente fueron los únicos sitios en todo el estudio, en donde predominó *Meloidogyne* sp, además los suelos de estos cables fueron caracterizados previamente como suelos supresivos a *R. similis*.

La cantidad de muestras de raíz positivas para *P. penetrans* en finca Cartagena fue de 1, lo cual correspondió al 25% del total (4 muestras). El porcentaje de muestras positivas respecto al total de muestras de raíz analizadas (28), fue del 3.58%. Las figuras 8, muestra la amplificación con los tres pares de iniciadores: SpollAB F/R, sigE F/R, y ATPF F/R, y su control positivo corroborado por medio de la electroforesis.

Cuadro 9. Muestras de Raíz de fincas bananeras.

Finca / planta	Muestras analizadas	Positivo	%	Negativo	%
Cartagena	4	1	25	3	75
Duacari II	5	0	0	5	100
Platanera	8	0	0	8	100
San Pablo	6	0	0	6	100
Rebusca	5	0	0	5	100
Total	28	1	3.58	27	96.42



Figura 8. Gel Agarosa 1% para la amplificación de tres pares de iniciadores específicos para *P. penetrans* (atpFF/R, SigEF/R, SpollABF/R) y control positivo. Finca Cartagena, muestra de raíz

En la figura 8 se observa que la muestra 12, da resultados positivos a la presencia de *P. penetrans*, debido a que sus tres pares de iniciadores específicos fueron amplificados por medio de electroforesis, además se observa que coincide con 300pb, el control positivo que se encuentra en el carril con el símbolo +.

Finca Cartagena al ser la única finca con resultados positivos a *Pasteuria penetrans* se sometió a una comprobación. Para ello se ingresó al laboratorio de biología molecular 14 muestras, la cantidad de muestras de raíz positivas en dicho sitio fue de 6, lo cual correspondió al 42.86% del total. Las figuras 9 y 10, muestran la amplificación con los tres pares de iniciadores: SpollAB F/R, sigE F/R, y ATPF F/R, y su control positivo ubicado en el carril con el símbolo de + corroborado por medio de la electroforesis.

Cuadro 10. Comprobación de resultados positivos mediante biología molecular a la presencia de *Pasteuria penetrans* en muestras de Raíz de la finca Cartagena.

Finca / planta	Muestras analizadas	Positivo	%	Negativo	%
Cartagena	14	6	42.86	8	57.14
Total	14	6	42.86	8	57.14

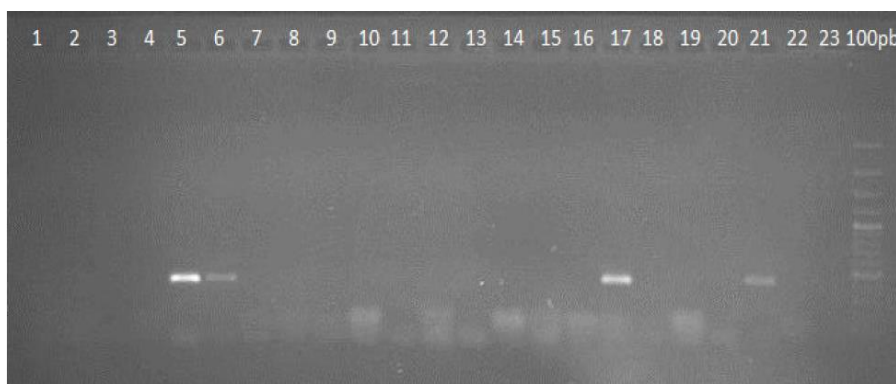


Figura 9. Gel Agarosa 1% para la amplificación de tres pares de iniciadores específicos para *Pasteuria penetrans* (SpollABF/R). Finca Cartagena, muestra de raíz de banano

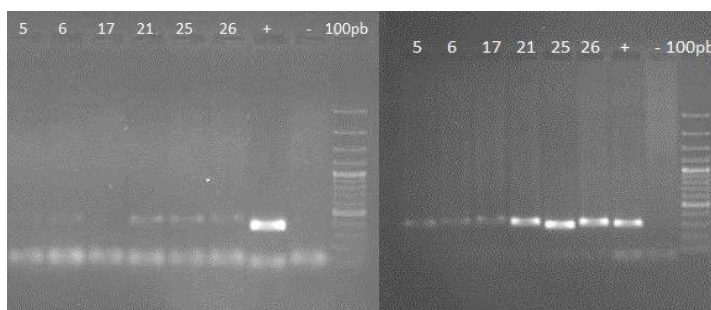


Figura 10. Gel Agarosa 1% para la amplificación de tres pares de iniciadores específicos para *Pasteuria penetrans* (SigEF/R y atpF/R). Finca Cartagena muestra de raíz de banano

6.4 Detección de *P. penetrans* en muestras de suelo rizosférico (SR) y suelo extrarizosférico (SER) analizadas por método molecular

Todas las muestras de suelo rizosférico (SR) y suelo extra rizosférico (SER), ingresadas al laboratorio de Biología Molecular, presentaron resultados negativos a la presencia de la bacteria. El total de muestras analizado fue de 56 (cuadro 11).

Cuadro 11. Análisis de muestras de suelo procedentes de fincas bananeras.

Finca	SR	SER	Cantidad de muestras ingresadas	Positivo	%	Negativo	%
Cartagena	4	4	8	0	0	8	100
Duacari II	5	5	10	0	0	10	100
Platanera	8	8	16	0	0	16	100
San Pablo	6	6	12	0	0	12	100
Rebusca	5	5	10	0	0	10	100
Total	28	28	56	0	0	56	100

* Suelo rizosférico (SR) y suelo extrarizosférico (SER).

Las fincas que se tuvieron resultados positivos en el primer muestreo a la presencia de *Pasteuria penetrans*, fueron sometidas a un segundo análisis para verificar la presencia de la bacteria. La finca Cartagena fue la única que dio positivo a la presencia de la bacteria en el primer muestreo, sin embargo con el segundo muestreo el 100% de las muestras de suelo dieron negativo a la presencia de *P. penetrans*. (Cuadro 12).

Cuadro 12. Comprobación de resultados mediante biología molecular a la presencia de *Pasteuria penetrans* en muestras de suelo de la finca Cartagena.

Finca	SR	SER	Cantidad de muestras ingresadas	Positivo	%	Negativo	%
Cartagena	6	6	12	0	0	12	100
Total	6	6	12	0	0	12	100

6.5 Detección de *P. penetrans* en muestras de raíz de plantas de tomate variedad JR (*Solanum lycopersicum*) analizadas por técnicas moleculares

De las 25 plantas de tomate variedad JR que fueron sembradas en potes con suelo con presencia de *Meloidogyne* sp., se seleccionó a las 5 plantas que manifestaron la mayor cantidad de nódulos. Su raíz fue analizada para la detección de *P. penetrans*. De estas 5 muestras, 3 indicaron la presencia de la bacteria, lo que correspondió al 60% del total (cuadro 13).

Para corroborar la detección, cada muestra se amplificó con los tres pares de iniciadores: SpollAB F/R, sigE F/R, y ATPF F/R, concordando con el control positivo que corresponde al carril con el símbolo de + corroborado por medio de la electroforesis.

Cuadro 13. Muestras de Raíz de plantas de tomate variedad JR analizadas mediante biología molecular para determinar la presencia de *P. penetrans*.

Finca / planta	Muestras analizadas	Positivo	%	Negativo	%
Tomate JR	5	3	60	2	40

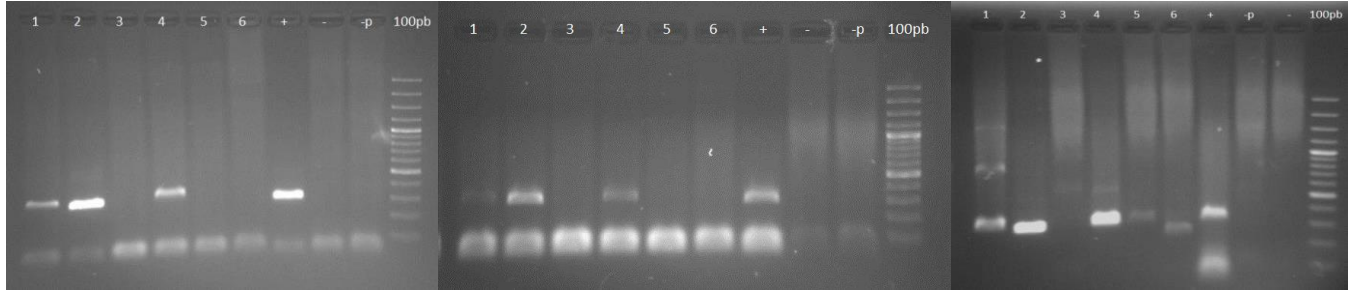


Figura 11. Gel Agarosa al 1% para la amplificación de tres pares de iniciadores específicos para *Pasteuria penetrans* en plantas de tomate variedad JR (atpF/R, SigEF/R. SpollABF/R).

En cuanto a las figura 11 se puede observar por medio de electroforesis, el resultado positivo de *P. penetrans* en las muestras 1, 2 y 4 por medio de los tres pares de iniciadores específicos.

6.6 Reproducción de *P. penetrans* utilizando plantas de tomate infectadas con *Meloidogyne* sp.

Los nematodos presentes en 25 gramos de raíz agallada, fueron extraídos de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 4.8. Estos nematodos se extrajeron de las plantas de tomate cultivadas con el suelo, donde se detectó la presencia de *Pasteuria penetrans* y *Meloidogyne* sp (Sección 6.5). La figura 12 muestra la raíz de una planta de tomate utilizada para la extracción de hembras de *Meloidogyne* sp, se puede observar la sintomatología que produce el nematodo.



Figura 12. Raíz de tomate Variedad JR infectada por *Meloidogyne* sp.

Fuente: Luis Carlos Oses Ramírez

Las figuras 13 y 14 muestran las características de los nematodos extraídas, las cuales exhiben un color opaco con tonos grisáceo o café. El color opaco se extiende hasta la zona del esófago. La figura 14 muestra posibles endósporas de *P. penetrans* dentro de hembras *Meloidogyne* sp antes de ser trituradas.



Figura 13. Nematodos extraídos de plantas de tomate Variedad JR para la obtención de endósporas de *P. penetrans*.

Fuente: Luis Carlos Oses R.

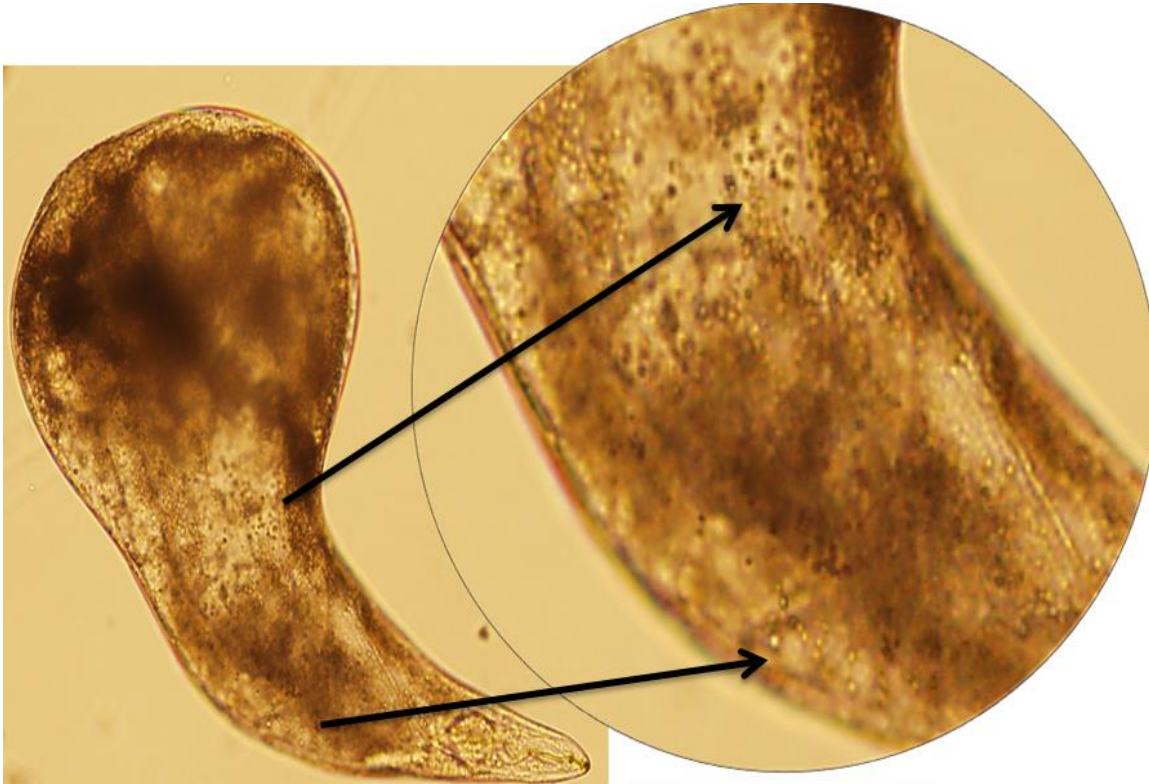


Figura 14. Hembras de *Meloidogyne* sp con posibles endósporas de *P. penetrans*.

Fuente: Luis Carlos Oses R.

En la figura 15 se observa estructuras con una conformación típica de endósporas de *P. penetrans* extraídas del cuerpo de hembras de *Meloidogyne* sp de raíces de las plantas de tomate.

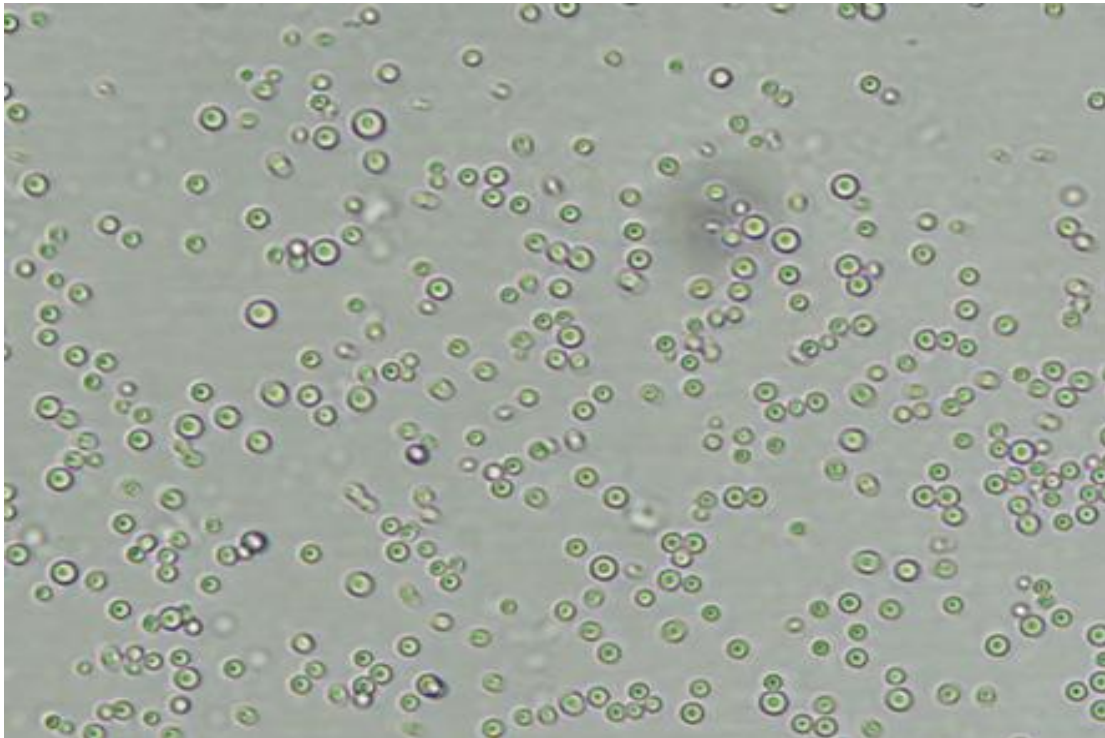


Figura 15. Suspensión de endósporas de *P. penetrans* a partir de hembras de *Meloidogyne* sp 40x.

Además de la extracción de endósporas a partir de los cuerpos de las hembras de *Meloidogyne* sp, también se extrajeron estructuras morfológicamente similares a partir de los huevos del nematodo. Sin embargo, su identidad no fue corroborada mediante biología molecular. Las figuras 16 y 17 muestran huevos de *Meloidogyne* sp recién triturados liberando dichas estructuras.

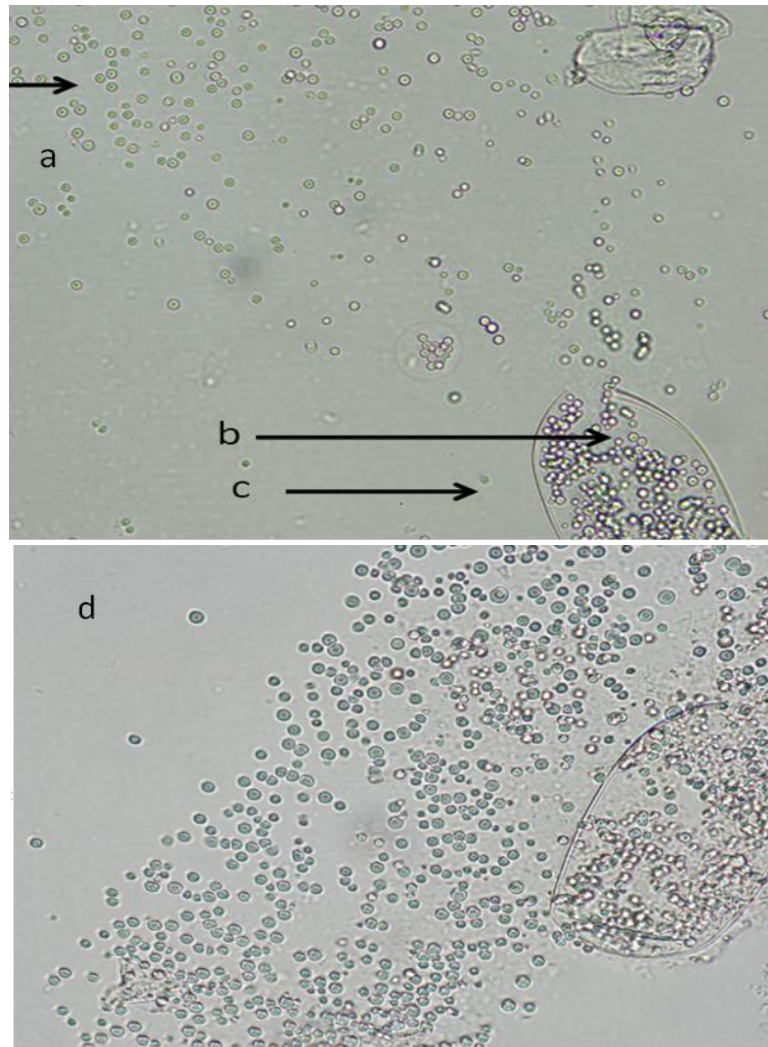


Figura 16. a) Endósporas de *P. penetrans*, b) Estructuras no identificadas, similares a endósporas de *P. penetrans* dentro del huevo de *Meloidogyne* sp. c) Huevo recién triturado de *Meloidogyne* sp. d) Posibles endósporas de *P. penetrans* saliendo de un huevo recién triturado 40x.



Figura 17. Estructuras muy similares a endósporas de *P. penetrans* dentro de un Huevo de *Meloidogyne* sp.

6.7 Detección molecular de *P. penetrans* en *Meloidogyne* sp extraídos de raíces de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) en invernadero

De 18 muestras de nematodos del genero *Meloidogyne* sp que se ingresaron al laboratorio de Biología Molecular, tres resultaron positivas a la presencia de *P. penetrans*, lo que correspondió al 16.7% del total (Cuadro14), estas corresponden a las muestras 5, 6 y 8. La amplificación de los tres pares de iniciadores (SpollAB F/R, sigE F/R, y ATPF F/R) fue corroborada mediante electroforesis (figura 18) y el control positivo se identifica con el símbolo +.

Cuadro 14. Muestras frescas de *Meloidogyne* sp.

Nematodo	Muestras ingresadas	Positivo	%	Negativo	%
<i>Meloidogyne</i> sp	18	3	16.7	15	83.3
Total	18	3	16.7	15	83.3

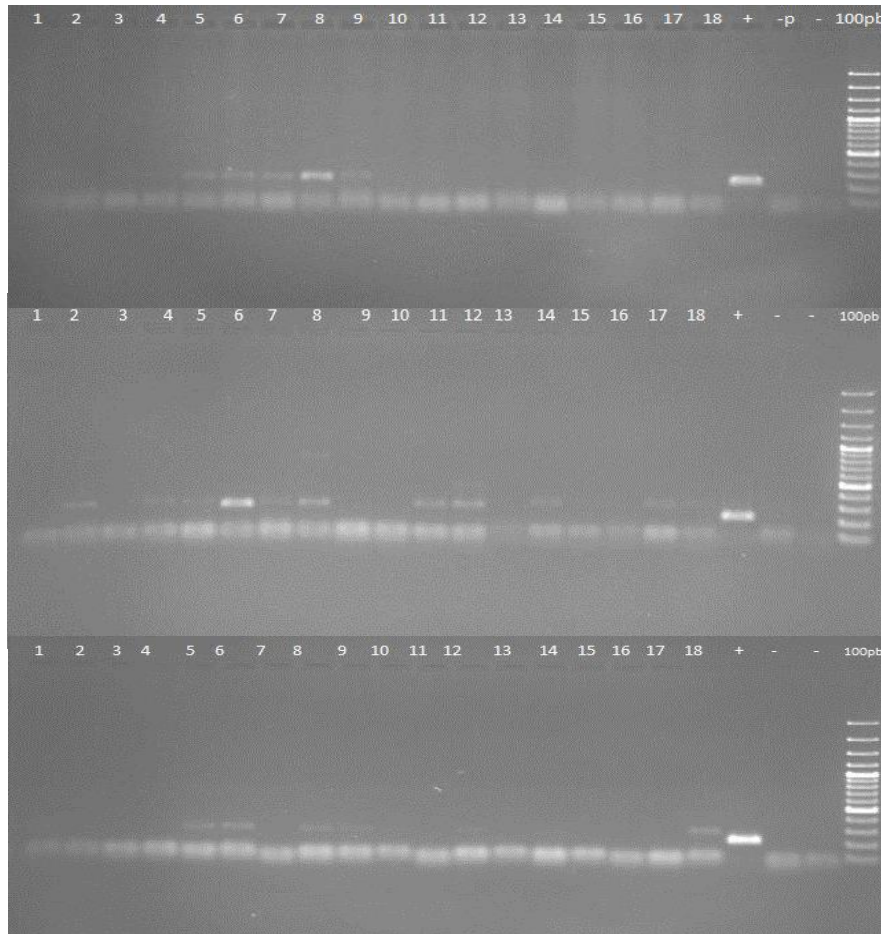


Figura 18. Gel Agarosa 1.5% para la amplificación de tres pares de iniciadores específicos para *Pasteuria penetrans* (atpF/R, SigEF/R, SpollABF/R).

6.7 Variables evaluadas

6.7.1 Estimación del nivel de adherencia de *P. penetrans* sobre *R. similis* y *Meloidogyne* sp.

6.7.1.1 Evaluación respecto al tiempo de exposición

El porcentaje de *Meloidogyne* sp. (J2) con presencia de endósporas de *P. penetrans* adheridas a su cutícula, se incrementó al transcurrir el tiempo de exposición, siendo del 16,67% a las 72 horas y del 31,67% a las 120 horas. Durante este lapso de 48 horas la adherencia aumentó en un 15%, situación que fue declarada con diferencias estadísticas ($P= 2.436 \times 10^{-5}$) (cuadro 15). La figura

19 muestra a dos nematodos J2 de *Meloidogyne* sp., con una endospora de *P. penetrans* adherida a su cutícula.

Cuadro 15. Nivel de adherencia a juveniles de *Meloidogyne* sp luego 72 y 120 horas de exposición con endósporas de *P. penetrans*.

Tiempo de exposición (horas)	N° de nematodos sin endósporas adheridas	N° de nematodos con endósporas adheridas
72	250 (83, 33%)	50 (16, 67%)
120	205 (68, 33%)	95 (31, 67%)

Prueba exacta de Fisher: $P = (2.436 \times 10^{-5})$

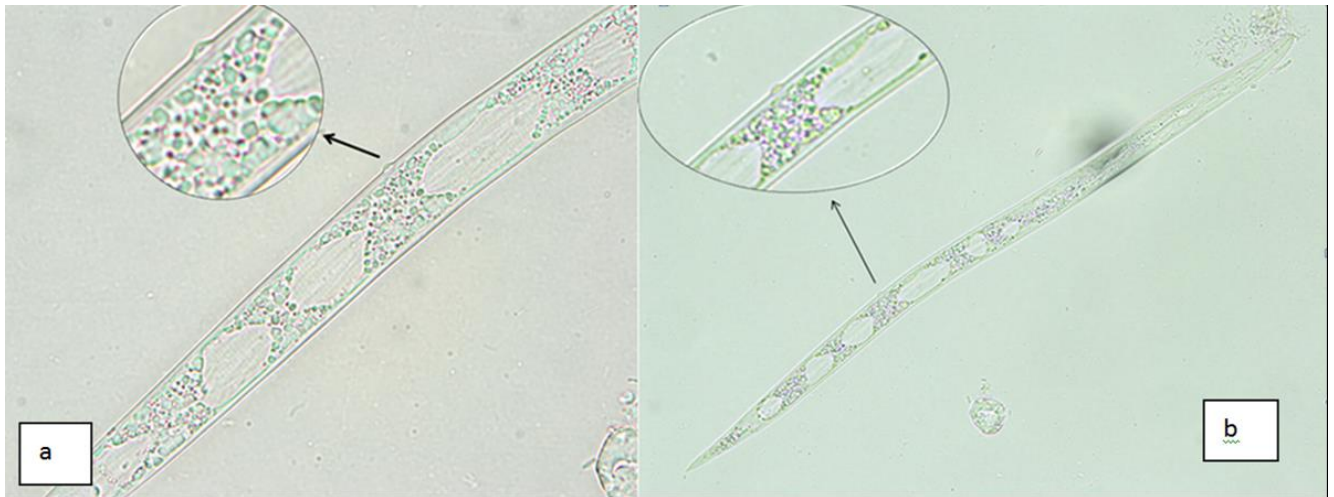


Figura 19. a). *Meloidogyne* sp. (J2) con 120 horas de exposición, presentando una endóspora de *P. penetrans* adherida a su cutícula. b). Fotografía a 40x de *Meloidogyne* sp. (J2) con 120 horas de exposición.

El porcentaje de *R. similis* con presencia de endósporas de *P. penetrans* adheridas a su cutícula, igualmente se incrementó al transcurrir el tiempo de exposición, pasando de 1.90% a las 72 horas, a 4.13% a las 120 horas; es decir, se presentó un aumento del 2.23% en un lapso de 48 horas (cuadro 16). A pesar de haber presentado un incremento en la adhesión de *P. penetrans* entre ambas evaluaciones, la prueba exacta de Fisher no reveló diferencias estadísticas ($P = 0.16$). La figura 20 muestra a un juvenil de *R. similis* con endosporas adheridas.

Cuadro 16. Nivel de adherencia de *R. similis* luego 72 y 120 horas de exposición con endósporas de *P. penetrans*.

Tiempo de exposición (horas)	N° de nematodos con endósporas adheridas	N° de nematodos sin endósporas adheridas
72	309 (98,10%)	6 (1,90%)
120	302 (95,87%)	13 (4,13%)

Prueba exacta de Fisher: P= (0.16)



Figura 20. Endósporas de *P. penetrans* adheridas en un juvenil de *R. similis* a las 120 horas.

6.7.2. Mortalidad de *Radopholus similis* y *Meloidogyne* sp tratados con *Pasteuria penetrans*.

6.7.2.1. Análisis de la mortalidad de nematodos a las 72 y 120 horas de exposición a *P. penetrans*, respecto al testigo

Luego de 72 horas de contacto de *Meloidogyne* sp., con endósporas de *P. penetrans*, se reportó una mortalidad del 2,67% sobre el nematodo y del 0% en el testigo sin la bacteria. Sin embargo, estos resultados no mostraron ser estadísticamente diferentes (P= 0.008) (cuadro 17).

A las 120 horas de contacto, la mortalidad de *Meloidogyne* sp, alcanzó el 11,67%, mientras que el testigo reportó un 8,20%. Los resultados indicados no mostraron ser estadísticamente diferentes entre sí (P= 0.204). (cuadro 18).

Cuadro 17. Mortalidad de juveniles (J2) de *Meloidogyne* sp, luego de 72 horas de contacto con *P. penetrans*.

Tratamiento	N° de Nematodos vivos	N° de nematodos muertos
Testigo	256 (100%)	0 (0%)
<i>P. penetrans</i>	292 (97.33%)	8 (2.67)

Prueba exacta de Fisher: $p = (0.008)$

Cuadro 18. Evaluación de la muerte con respecto al testigo por medio de *P. penetrans* en nematodos de *Meloidogyne* sp J2 a las 120 horas.

Tratamiento	N° de Nematodos vivos	N° de Nematodos muertos
Testigo	235 (91.80%)	21 (8.20%)
<i>P. penetrans</i>	265 (88.33%)	35 (11.67%)

Prueba exacta de Fisher: $p = (0.204)$

Los resultados con *R. similis* mostraron una mortalidad del 0,32% a las 72 horas (cuadro 19), y del 4,13% a las 120 horas (cuadro 20), mientras que el testigo no reportó mortalidad de los nematodos. El análisis estadístico no reveló diferencias estadísticas a las 72 horas de contacto ($P=1$), pero sí a las 120 horas ($P = (3.706 \times 10^{-4})$).

Cuadro 19. Evaluación de la muerte con respecto al testigo por medio de *P. penetrans* en nematodos de *R. similis* a las 72 horas.

Tratamiento	N° de Nematodos vivos	N° de Nematodos muertos
Testigo	262 (100%)	0 (0%)
<i>P. penetrans</i>	314 (99.68%)	1 (0,32%)

Prueba exacta de Fisher: P= (1)

Cuadro 20. Evaluación de la muerte con respecto al testigo por medio de *P. penetrans* en nematodos de *R. similis* a las 120 horas.

Tratamiento	N° de Nematodos vivos	N° de Nematodos vivos
Testigo	262 (1.00%)	0 (0%)
<i>P. penetrans</i>	302 (95.87%)	13 (4.13%)

Prueba exacta de Fisher: p= (3.706x10⁻⁴)

6.7.2.2. Análisis de la mortalidad de los nematodos, respecto al tiempo de exposición con *P. penetrans*

La mortalidad de *Meloidogyne sp.*, se incrementó al transcurrir el tiempo de exposición, pasando del 2.67% a las 72 horas, al 11.67% a las 120 horas; es decir, se manifestó un incremento fue del 9% en un lapso de 48 horas. El análisis estadístico demostró que los resultados no fueron producto del azar, sino del efecto del tiempo de exposición (P= 2.208x10⁻⁵) (Cuadro 21).

Cuadro 21. Mortalidad de *Meloidogyne* sp luego de 72 y 120 horas de exposición con endósporas de *P. penetrans*.

Tiempo de exposición (horas)	N° de Nematodos vivos	N° de Nematodos muertos
72	292 (97.33%)	8 (2.67%)
120	265 (88.33%)	35 (11.67%)

Prueba exacta de Fisher: $P= (2.208 \times 10^{-5})$

De manera similar, la mortalidad de *R. similis* se incrementó al transcurrir el tiempo de exposición, pasando del 0.32% a las 72 horas, al 4.13% a las 120 horas; en este caso, el incremento en 48 horas fue del 3.81%. Estos resultados mostraron ser estadísticamente diferentes y no debidos al azar ($P= 0.0016$) (cuadro 22).

Cuadro 22. Mortalidad de *R. similis* luego de 72 y 120 horas de exposición con endósporas de *P. penetrans*.

Tiempo de exposición (horas)	N° de Nematodos vivos	N° de Nematodos vivos
72	314 (99.68%)	1 (0.32%)
120	302 (95.87%)	13 (4.13%)

Prueba exacta de Fisher: $P= (0.0016)$

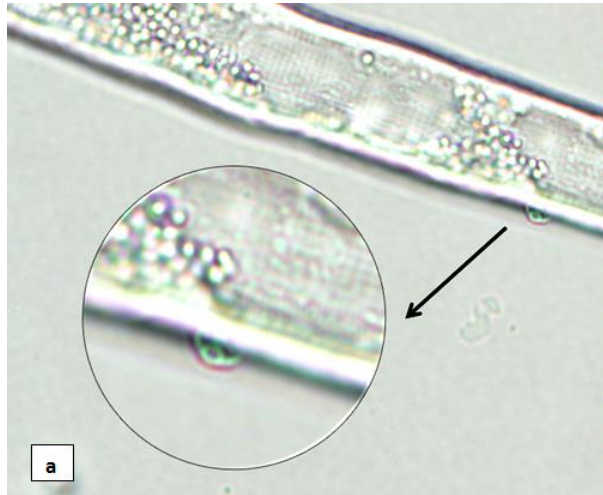


Figura 21. . a) Endospora de *P. penetrans* adheridas a un juvenil de *R. similis* a las 72 horas de exposición.

Fuente: Luis Carlos Oses R.

7. Discusión

7.1 Caracterización de condiciones edáficas, agroecológicas existentes de cada punto de muestreo

El muestreo realizado en las fincas abarcó las principales variedades de banano para exportación. Además, consideró plantaciones de más de 7 años de establecidas. Los análisis nematológicos (Anexo 1), procedentes de muestras de suelo y raíz permitieron identificar el complejo típico conformado por *R. similis*, *Helicotylenchus* sp, *Meloidogyne* sp y *Pratylenchus* sp, lo que concuerda con Araya (2003). Al encontrar este complejo de hospederos potenciales para organismos antagónicos, es probable detectar a la bacteria *P. penetrans*. Jonathan *et al.* (2000) demostraron que esta bacteria puede beneficiar de una manera significativa el crecimiento de las plantas de banano, debido a la reducción de agallas y por ende la disminución de nematodos del genero *Meloidogyne* sp.

De todas las fincas, solo en finca Cartagena se detectó la presencia de *P. penetrans*. Esto se atribuyó principalmente a la gran población de *Meloidogyne* sp

presente en los cables muestreados (cable 24 y 25), ya que según lo reportan Van Gundy (1985), Verdejo y Jaffe (1988), Oostendorp et al. (1990), Chen (1996), Channer et al. (1997), Chen y Dickson (1998), Hewlett y Serracin (1999), Freitas et al. (2000), Bird et al. (2003), Dabiré y Mateille (2004) y Gómez et al. (2010), esta bacteria es muy afín al género *Meloidogyne*.

A pesar de los esfuerzos que realizan algunas fincas en cuanto a la implementación de prácticas que favorecen la salud y calidad del suelo bananero, tales como la aplicación intensiva de materia orgánica, uso de coberturas vivas y disminución de la erosión, que son prácticas que promueven el desarrollo y la proliferación de *P. penetrans* (Gómez et al. 2012), en fincas como Platanera Río Sixaola, Rebusca, San Pablo y 28 millas, no se detectó la presencia de la bacteria. Por tal razón, queda claro que la presencia de la bacteria está ligada íntimamente a la presencia de *Meloidogyne* sp., tal como sucedió en finca Cartagena (cable 24 y 25).

Por otra parte, contrario a lo que señalan Van Gundy (1985), Chand (1994), Chen (1996), Gómez et al. (2010) Gómez et al (2012) Dabiré y Mateille (2004), en cuanto a que la infección de *P. penetrans* se ve favorecida cuando el contenido de humedad del suelo es alto, en el presente estudio este no fue un factor determinante en la presencia de *P. penetrans*. Fincas como Duacari 2, Rebusca, San Pablo y 28 millas, al igual que Cartagena, presentan suelos con contenidos de humedad normalmente altos, como resultado de su ubicación geográfica dentro de una zona con un fuerte régimen de precipitaciones.

Por otra parte, hacer una interpretación del efecto de la fertilización y su impacto sobre el pH, en relación a la proliferación de *P. penetrans*, es difícil. Diferentes estudios indican que el rango óptimo de pH que favorece la adherencia de la bacteria a los nematodos van desde 4.5 a 8.5 (Chand 1994; Chen y Dickson 1998; Gómez et al. 2010, y todas las fincas muestreadas incluyendo a Cartagena, están dentro de dicho rango de pH (Anexo 2).

En cuanto a la posible relación entre el uso de herramientas complementarias de control de plagas, como lo es la aplicación de agentes de control biológico y la presencia natural de *P. penetrans*; debido a que el 60% de las fincas muestreadas utiliza esta herramienta, pero solo en una de ellas se detectó a la bacteria, no se considera a este factor como determinante.

Un caso similar aconteció con relación al uso de abonos orgánicos. Si bien Castro et al. (2011) indican que el uso de estos sustratos puede incrementar la presencia de *P. penetrans* y la biomasa de las plantas, considerando que el 100% de las fincas muestreadas los aplican en mayor o menor medida, pero solo una de las fincas reportó a la bacteria, no se considera a este factor como determinante en su presencia.

Adicionalmente, Gómez et al. (2012) reportan que *P. penetrans* está presente en fincas orgánicas o que están en transición hacia ese sistema de producción. En el estudio realizado, la finca que presenta un sistema de producción convencional, pero más cercano a la agricultura orgánica, es finca Platanera Río Sixaola; no obstante, esta finca no reportó la presencia de *P. penetrans*. Finca Cartagena por el contrario que produce bajo un esquema más tradicional (aunque con reducida aplicación de nematicidas), sí reportó la presencia de *P. penetrans*, situación relacionada como se indicó, a su alta población de *Meloidogyne* sp, principal hospedante de la bacteria.

La textura arenosa del suelo juega un papel importante en la absorción y retención de las esporas de *P. penetrans*. Talavera y Mizukubo (2003) indican que bajo un porcentaje de arena de 62.2%, hay más oportunidad para la multiplicación de *P. penetrans*. Similarmente, estudios realizados por Van Gundy 1985, Verdejo y Jaffe (1988), Oostendorp et al. (1990), Chen et al. (1996), Channer et al. (1997) Chen y Dickson (1998), Hewlett y Serracin (1999), Freitas et al. (2000), (Bird et al. 2003), Dabiré y Mateille (2004), Zwart et al. (2005), Gómez et al. (2010), indican que el rango de contenido de arena que favorece la presencia de *P. penetrans* en el suelo es entre 71 y un 78 %. En finca Cartagena, según los análisis texturales

realizados (Anexo 2), el porcentaje de arena en los sitios muestreados fue superior al 70%, mientras que las otras fincas muestreadas que no reportaron a la bacteria, el porcentaje de arena fue inferior al 60%. Por tanto, la textura arenosa podría ser el segundo condicionante de la presencia de *P. penetrans*.

En las fincas muestreadas, nematodos como *R. similis*, *Meloidogyne* sp, *Helicotylenchus* sp, y *Pratylenchus* sp, son abundantes concordando con Araya 2003 y Araya 2004; sin embargo, el suelo del cable 24 y 25 de la finca Cartagena, no mostró la presencia de *R. similis*, considerándose por tanto, como un posible suelo supresivo a esta especie. Por el contrario, este suelo mostró una gran densidad poblacional *Meloidogyne* sp. Si esta característica se mantiene a través del tiempo bajo condiciones de manejo similares, se podría establecer que dichos cables muestran supresividad hacia *R. similis*, sobre todo considerando que según Araya (2003 y 2004), lo más común en plantaciones bananeras con varios años de establecidas, es encontrar altas poblaciones del nematodo. Hay que considerar como se informó inicialmente, que ninguna de las plantaciones muestreadas, tenía una edad menor a 3 años. Investigaciones realizadas por Hewlett y Serracin (1999), Freitas et al. (2000), Bird et al. (2003), Dabiré y Mateille (2004), Zwart et al. (2005), Gómez et al. (2010), establecen que a mayor presencia de *Meloidogyne* sp., mayor presencia de *P. penetrans*.

7.2 Detección e identificación de *P. penetrans* en muestras de raíz de banano y tomate analizadas por método molecular

Tres pares de iniciadores específicos: SigEF/R, SpollABF/R y atpFF/R fueron efectivos para comprobar la presencia de *P. penetrans* por medio de técnicas moleculares como el PCR (Schmidt et al. 2004; Nong et al. 2007; Schmidt et al. 2008). Del total de las muestras de raíz de plantas de banano colectadas en finca Cartagena, se logró amplificar bandas congruentes de bases (300pb) a las que produce *Pasteuria penetrans*. Esto concuerda con lo indicado por Isurita (2009),

quien logró detectar *P. penetrans* mediante PCR convencional con los iniciadores específicos SpollABF/R, SigEF/R, concordando con bandas simples en la electroforesis de 300pb (Schmidt et al. 2004 y Schmidt et al. 2008).

Del total de muestras de raíz de plantas de tomate (variedad JR) severamente infestadas por *Meloidogyne* sp, el 60% fueron positivas para la presencia de *P. penetrans*. Debido a que en este estudio se utilizaron aislamientos de la bacteria extraídos directamente de su hospedero y suelo no estéril, y cepas no puras como en las investigaciones realizadas por Talavera y Mizukubo (2003); Schmidt et al. (2004); Sturhan et al. (2005); Nong et al. (2007); Tateishi et al. (2007); Schmidt et al. (2008); Isurita (2009), el porcentaje de detección fue moderado. Este tipo de muestras presentan el problema de contaminación con ADN de microflora y microfauna y también una concentración baja del ADN de la bacteria que es insuficiente para entrar dentro del umbral de detección razón por la cual pudo haber sido un factor influyente en la obtención de más resultados positivos.

La posibilidad de obtener resultados positivos en las muestras, se da principalmente por la congruencia de factores bióticos y abióticos que favorecen la presencia y el desarrollo de la bacteria con los sitios de muestreo. En ese sentido, se establecen dos factores principales: la presencia de *Meloidogyne* sp Van Gundy (1985); Verdejo y Jaffe (1988); Oostendorp et al. (1990); Chen et al. (1996); Channer et al. (1997); Chen y Dickson (1998); Hewlett y Serracin (1999); Freitas et al. (2000); Bird et al. (2003); Cetintas y Dickson (2004); Dabiré y Mateille (2004); Zwart et al. (2005); Gómez et al. (2010); y un alto porcentaje de arena en el suelo. Talavera y Mizukubo (2003); Dabiré y Mateille (2004)).

7.2.1 Detección e identificación de *P. penetrans* en muestras de suelo rizosférico y suelo extrarizosférico analizadas por método molecular

Factores de concentración de la bacteria en el suelo, en comparación con su concentración en las raíces de banano y propiamente en los nematodos dentro de éstas, pueden explicar por qué razón no se determinó la presencia de la bacteria

en las muestras de suelo mediante técnicas moleculares. La bacteria *P. penetrans* es un parásito obligado, por lo su presencia es mayor en los sitios en donde su hospedante (nematodos endoparásitos) se encuentra en mayor concentración; valga señalar, que eso sucede en el interior de las raíces.

Estos resultados son congruentes con lo descrito por Bird *et al.* (2003) y Piedra (2008) quienes señalan que a pesar de que se produce liberación de endósporas de *P. penetrans* de las raíces al suelo, es muy difícil detectarlas en este.

7.3 Aislamiento y multiplicación de *P. penetrans* utilizando plantas de tomate con *Meloidogyne* sp.

Según Darban *et al.* (2005) la técnica para la reproducción *in vivo* de *P. penetrans*, utilizando plantas de tomate infectadas con *Meloidogyne* sp, es un método viable y eficaz. De acuerdo a estudios realizados por Bird *et al.* (2003); Cetintas y Dickson (2004); Dabiré y Mateille (2004); Zwart *et al.* (2005); Gómez *et al.* (2010) la producción de la bacteria bajo condiciones de suelo no estéril se incrementa en el tiempo, al producirse más ciclos del nematodo. En el presente estudio, plantas de tomate con 40 días de haber germinado, se sembraron en potes con suelo no estéril con fuerte presencia de *Meloidogyne* sp.; sin embargo, quizá los 2 meses en que se mantuvieron las plantas, no fue un período lo suficientemente largo para permitir una alta reproducción de la bacteria y por esto, solo fue detectada en el 60% de las muestras.

Es posible también que *P. penetrans* enfrentara un efecto antagónico de la microbiota presente en el suelo no estéril, limitando su reproducción y la regulación del nematodo. Por el contrario, en estudios similares en los que se ha utilizado suelos estériles y cepas de puras de *P. penetrans*, los niveles de control del nematodo han sido altos Van Gundy (1985); Verdejo y Jaffe (1988); Oostendorp *et al.* (1990); Chen *et al.* (1996); Channer *et al.* (1997); Chen y Dickson (1998); Hewlett y Serracin (1999); Freitas *et al.* (2000); Bird *et al.* (2003); Cetintas y Dickson (2004); Dabiré y Mateille (2004); Zwart *et al.* (2005); Gómez *et al.* (2010); Talavera y Mizukubo (2003) y Dabiré y Mateille (2004).

7.4 Extracción de endósporas de *P. penetrans* a partir de *Meloidogyne* sp.

El método utilizado por Hewlett y Serracin (1999) resultó ser muy viable para la obtención de las endósporas para los bioensayos *in vitro*. El procedimiento de extracción de endosporas de esta investigación fue muy similar al descrito por estos investigadores. Dicha metodología también se fundamentó en la descrita por Castro *et al.* (2011).

La extracción de endosporas presentó dificultades como la contaminación con residuos de raíz principalmente. Sin embargo, se pudo extraer endosporas de los nematodos que estaban a disposición. Se obtuvo una cosecha total de 2.08×10^6 endósporas a partir de hembras infectadas por la bacteria.

7.5 Bioensayo de *P. penetrans* con *R. similis* y *Meloidogyne* sp.

La suspensión acuosa de endósporas de *P. penetrans* tuvo una concentración de 8.67×10^4 endósporas/ml; dicha concentración fue efectiva a la hora de la adhesión de endosporas a la cutícula de *R. similis* y *Meloidogyne* sp. Miranda (1993), utilizó una concentración de endosporas de 10^6 y encontró una adhesión de 4 a 8 endosporas por nematodo. Freitas *et al.* (2000) bajo condiciones de invernadero con plantas de tomate, encontró que una suspensión de 1.27×10^5 endósporas/ml, fue capaz de reducir en un 99% poblaciones de *Meloidogyne arenaria*. Verdejo y Jaffe (1988), bajo condiciones de invernadero, demostró mediante la aplicación de una concentración de $5,0 \times 10^5$ endósporas de *P. penetrans*, un nivel de control sobre *Meloidogyne javanica* en plantas de tomate y papa. Estudios realizados por Darban *et al.* (2005) comprobaron, que suspensiones de 1.22×10^4 endosporas/ml, era capaz de provocar adherencia en nematodos de *Meloidogyne* sp.

En el experimento *in vitro*, la aplicación de 8.67×10^4 endósporas/ml a los nematodos, permitió porcentajes de adherencia sobre *Meloidogyne* sp, y *R. similis* del 31.67% y 4.13%, respectivamente. Rojas y Marbán (1999) comprobaron que la adherencia de endósporas de *P. penetrans* a la cutícula de nematodos como *M. incognita* y *M. arabicida*, se incrementan con el tiempo, lo que concuerda con los

resultados aquí reportados. La adherencia de *Meloidogyne* sp aumentó de las 72 horas a las 120 horas en un 15% reportando diferencias estadísticas ($p=2.436 \times 10^{-5}$). La adhesión de *P. penetrans* sobre *R. similis*, aumentó en el mismo rango de tiempo, sin embargo, la adherencia de las endosporas a la cutícula de *R. similis* no mostró diferencias estadísticas ($p= 0.16$).

Estos resultados de adherencia sobre *Meloidogyne* sp concuerdan con Chen (1996); Rojas y Marbán (1999); Verdejo y Jaffe (1988); Chen y Dickson (1998); Channer et al. (1997); Piedra (2008); Oostendorp et al. (1990); Bird et al. (2003); Gómez et al. (2010), en donde se manifiesta que *P. penetrans* es altamente específico hacia *Meloidogyne* sp.

No obstante, no se encontró información previa que indicara que *P. penetrans* puede adherirse a la cutícula de *R. similis* y tampoco, que tuviese efecto en la mortalidad del nematodo, al menos bajo condiciones de laboratorio; por lo cual se presume que este sería el primer reporte a nivel mundial al respecto. En esta investigación ambas situaciones fueron comprobadas y documentadas visual y estadísticamente. En este caso la mortalidad de *R. similis* fue del 0.32% a las 72 horas, y del 4.13% a las 120 horas, reportando diferencias significativas ($p= 0.0016$). Se pudo comprobar también que el aislamiento de *P. penetrans* fue más patogénico sobre *Meloidogyne* sp, respecto a *R. similis*, lo cual concuerda con los estudios previamente citados que señalan a *Meloidogyne* sp., como susceptible a ser parasitado por la bacteria. Es posible también que la baja concentración utilizada ($8,67 \times 10^4$ endósporas/ml), en comparación con concentraciones más altas evaluadas en los estudios citados, fuese un factor que resultara en un menor nivel de mortalidad de ambos nematodos. Las diferencias en cuanto a mortalidad respecto al testigo, sugieren que el procedimiento experimental fue eficiente para conservar en buenas condiciones a los nematodos.

El efecto del tiempo de contacto bacteria-nematodos, tuvo para *R. similis* un efecto significativo en su mortalidad; a las 72 horas no había mortalidad, y a las 120 horas, se presentó un 4.13 %. Estos datos según los estudios estadísticos, no fueron producto del azar ($p= 3.706 \times 10^{-4}$).

No se ha documentado que al momento de adherirse a los nematodos, *P. penetrans* tenga la capacidad de matarlos en alguna medida; sin embargo, en la presente investigación, los análisis estadísticos comprobaron preliminarmente que esto sí es factible.

Es importante recalcar que en esta investigación queda demostrado a través de pruebas fotográficas, que *P. penetrans* puede adherirse a *R. similis*. Existe información sobre la adherencia de endosporas de *P. penetrans* sobre nematodos con características muy similares a *R. similis* como por ejemplo *Pratylenchus* spp (Sayre et al. (1988)); sin embargo, este nematodo es un hospedero principal de otra especie *Pasteuria thornei* (Chen y Dickson (1998); Gonzaga y Santos (2009)). No hay información que compruebe la adherencia de *P. penetrans* sobre *R. similis* por lo cual esta información puede considerarse como el primer informe sobre el tema, además es importante mencionar que la presente investigación arroja como aporte estructuras muy similares a endósporas dentro de huevos de *Meloidogyne* sp., sin embargo, es necesario corroborarlo por medio de análisis moleculares.

Estudios realizados por Verdejo y Jaffe (1988); Oostendorp et al. (1990); Chen et al. (1996); Channer et al. (1997); Hewlett y Serracin (1999); Freitas et al. (2000); Bird et al. (2003); Carneiro et al. (2007); y Gómez et al. (2010), han señalado que *Pasteuria penetrans* tiene como hospedero principal a *Meloidogyne* spp, lo que concuerda con el presente estudio. Otro factor importante a considerar es la temperatura en la cual se desarrolló el estudio (26°C), lo que es congruente con el rango óptimo (25°C a 30°C), para la efectiva adhesión a los nematodos, según lo descrito por Hatz y Dickson (1992).

La presente investigación comprobó que *Pasteuria penetrans* tiene la capacidad de adherirse a la cutícula de *Radopholus similis* y mediante un mecanismo no identificado, provocar en alguna medida su muerte bajo condiciones de laboratorio, sin embargo, para tener más certeza de ello es necesario realizar más investigaciones al respecto. Lo anterior es contrario a lo reportado por Sharmila (2012), quien no encontró evidencia sobre la adherencia de la bacteria en *R.*

similis en estudios de laboratorio realizados con endósporas de *P. penetrans* extraídas de nematodos provenientes de raíces de un jardín botánico.

8. Conclusiones

- La técnica de PCR, fue eficaz para determinar la presencia o ausencia de *P. penetrans* en muestras raíz de banano, de tomate (variedad JR), y de nematodos, en relación a su identificación mediante otros métodos utilizados como la métodos de identificación con base en características morfológicas.
- Las muestras de suelo son muy difíciles para la extracción de material genético, ya que hay muchos inhibidores del PCR. Además los iniciadores fueron diseñados para PCR tiempo real que posee más resolución que el PCR punto final que fue el que se utilizó en el experimento.
- La alta densidad poblacional del nematodo *Meloidogyne* sp., y la textura arenosa presente en los cables 24 y 25 de finca Cartagena, fueron los dos factores determinantes para que la bacteria pudiese ser detectada en esta investigación.
- El método de aislamiento y multiplicación de *P. penetrans* mediante plantas de tomate infestadas con *Meloidogyne* sp, es una manera viable de obtener endósporas de esta bacteria. Sin embargo, hacerlo con suelo no estéril es una limitante por el efecto antagónico que sufre la bacteria.
- La bacteria *Pasteuria penetrans* está muy lejos de ser un agente de control biológico contra *R. similis* en el cultivo de banano, debido a que hace falta muchas investigaciones que demuestren lo contrario.

9. Recomendaciones

- Se debe de aumentar las investigaciones del efecto de *Pasteuria penetrans* contra el nematodo barrenador *Radopholus similis*, debido a que la presente investigación evidenció cierta adherencia al nematodo barrenador. Es importante además contar con cepas purificadas para que las futuras investigaciones sean más efectivas.
- Se debe de dar seguimiento a los cables 24 y 25 de la Finca Cartagena, ya que puede ser un excelente inóculo de esta bacteria, sin embargo es importante tomar en cuenta la gran cantidad de microorganismos benéficos. Por lo tanto necesario hacer un estudio minucioso de lugar para poder determinar qué tipos de simbiosis se encuentran.
- Seguir haciendo bio prospecciones en las fincas que no dieron resultados positivos y en otras zonas que no se agregaron a la investigación, ya que las fincas sometidas al estudio tienen características agroecológicas que podrían favorecer el desarrollo de este tipo de bacterias. Hay que darle mucha importancia a los suelos de los cables 24 y 25 ya que es un suelo que puede llegar a ser caracterizado como supresivo contra *R. similis*.
- El protocolo establecido para evaluar la adherencia de *Pausteria penetrans*, sobre el nematodo barrenador, *R. similis*, bajo condiciones *in vitro*, se puede mejorar conforme avance las investigaciones, es de gran importancia mantener la temperatura adecuada y tener una solución de endósporas mayores de 10^5 , porque favorecería la adherencia de endósporas en los nematodos.

10. Literatura citada.

Agrios, G. 2005. *Plant pathology*. 5 ed. Nueva York, United States. Elsevier Academic Press. 922p.

Altieri, M.A; Nicholls, C. 2000. Agroecología: Teoría y práctica para una agricultura sustentable. Primera edición. Red de Formación Ambiental para América Latina y el Caribe. México D.F., México.

Araya, M. 2003. Situación actual del manejo de nematodos en banano (*Musa AAA*) y plátano (*Musa AAB*) en el trópico americano. En Rivas, G., y Rosales, F. (eds.), *Manejo Convencional y alternativo de la Sigatoka Negra, Nematodos y Otras Plagas Asociadas al Cultivo de Musáceas en los Trópicos* (pp. 79-102). Francia: INIBAP

Araya, M. 2004. Los fitonematodos del banana (*Musa AAA* subgrupo Cavendish cultivares Grande, Naine, Valery y Williams) su parasitismo y combate. XVI Reunión internacional ACROBAT. 84-99.

Arcuri, E; Wiedmann, M; Boor, K. 2000. Phylogeny and functional conservation of σE in endospore-forming bacteria. Cornell University, Ithaca, USA. *Microbiology*. 146: 1593–1603

Arias, L; Chaves, C; Solano, G. 2010. Evaluación de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la detección e identificación de *Listeria monocytogenes* en queso fresco proveniente del área metropolitana de San José, Costa Rica. Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales, Facultad de microbiología, Universidad de Costa Rica, Costa Rica. 60 (4).

Atibalentja, N; Noel, G; Ciancio, A. 2004. A Simple Method for the Extraction, PCR amplification, Cloning, and Sequencing of *Pasteuria* 16S rDNA from Small Numbers of Endospores. *Revista de Nematología* 36, (1).

Barrios, M. 2006. Estudio de hongos endofíticos como inductores de resistencia para el control de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en plátano. Tesis. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza.

Bird, D; Opperman, C; Davies, K. 2003. Interactions between bacteria and plant-parasitic nematodes: now and then. Center for the Biology of Nematode Parasitism, Box 7253, North Carolina State University, Raleigh, NC 27695, USA Nematode Interactions Unit, Rothamsted Research Limited, Harpenden, Herts AL5 2JQ, UK

Bravo, V; De la Cruz E; Herrera, G; Ramírez, F. 2013. Uso de plaguicidas en cultivos agrícolas como herramienta para el monitoreo de peligros en salud. Revista Uniciencia 27 (1): 351-376.

Camacho, A. 2013. Bananeros ganaron \$ 639 ,8 millones. Periódico el financiero [en línea]. Sección negocios. Consultado el 23 de junio del 2013. Disponible en: http://www.elfinancierocr.com/ef_archivo/2012/febrero/26/negocios3074014.html

Cano, A; Gonzales, D. 2011. F1 F0- ATP sintasa y sus diferencias estructurales. Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular. Universidad Autónoma de México. México D.F. 30(3): 98-108.

Carneiro, R; De Mesquita, L; Cirotto, P; Mota, F; Almeida, MR; Cordeiro, MC.2007. The effect of Sandy soil, bacterium dose and time on the efficacy of *Pasteuria penetrans* to control *Meloidogyne incognita* race 1 on coffee. Nematology. 9(6):845-851.

Castro, L; Flores, Lorena; Uribe, Lidieth. 2011. EFECTO DEL VERMICOMPOST Y QUITINA SOBRE EL CONTROL DE *Meloidogyne incognita* EN TOMATE A NIVEL DE INVERNADERO. San José. Costa Rica. Agronomía Costarricense 35(2): 21-32

Cetintas, R; Dickson, D. 2004. Persistence and Suppressiveness of *Pasteuria penetrans* to *Meloidogyne arenaria* Race1. Journal of Nematology 36(4): 540-549.

Charles, L; Carbone, I; Davies, K; Bird, D; Burke, M; Kerry, B; Opperman, C. 2005. Phylogenetic Analysis of *Pasteuria penetrans* by Use of Multiple Genetic Loci. Revista de Bacteriología 187 (16) :5700–5708. Center for the Biology of Nematode Parasitism, Department of Plant Pathology, North Carolina State University

Chand, R; Gill, J.S. 1994. Effect of abiotic factors on spore attachment of *Pasteuria penetrans* to juveniles (J2) of *Meloidogyne incognita*. Indian Journal of Nematology (24): 195–199.

Channer, A; Gowen, S; Ahmed, R. 1997. Studies on the potential use of *Pasteuria penetrans* as a biocontrol agent of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). Revista de Patologia de las Plantas 46. Departament of Agriculture. University of reading. UK

Chaves, N. 2007. Utilización de bacterias y hongos endófitos para el control biológico del nematodo barrenador *Radopholus similis* (Cobb) Thorn. Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. Escuela de Posgrado, Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 98p

Chen, Z. 1996. Biological Control Potential of *Pasteuria penetrans*. Tesis. University of Florida.

Chen, Z; Dickson, D. 1998. Review of *Pasteuria penetrans*: Biology, Ecology, and Biological Control Potential. Revista de Nematología 30(3): 313-340.

Cocom, 2005. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE EXTRACTOS VEGETALES SOBRE *Radopholus similis* y *Colletotrichum gloeosporioides*. Tesis. Lic. Universidad EARTH. Guácimo, Costa Rica.

CORBANA (Corporación Bananera Nacional S.A). 2010. Corrección de un pH bajo y de una alta acidez de los suelos bananeros mediante la incorporación de enmiendas cálcicas (encalado) con la práctica del “forqueo”. Hoja divulgativa N° 3.

CORBANA (Corporación Bananera Nacional S.A). 2011. Implementación de Buenas Prácticas Agrícolas para Reducir el Esguerrimiento de Plaguicidas en el Cultivo del Banano de la Región Caribe Costarricense. Reporte Estudio de Caso.

CORBANA (Corporación Bananera Nacional S.A). 2013. Historia Industria Bananera. (En línea). Consultado 10 de Diciembre del 2014.

CORBANA (Corporación Bananera Nacional S.A). 2014. Destino de las exportaciones. (En línea). Consultado 10 de Diciembre del 2014.

Cortazar; A, Silva; E. 2004. PCR, Métodos físico- químicos en biología molecular. Universidad Nacional Autónoma de México.

Darban, D. Gowen, S.Pembroke, B y Mahar, A. 2005. Developmentas affected *Pasteuria penetrans* in *Meloidogyne javanica* females as affected by constantly high vs fluctuating temperature in an in-vivo system. Department of Agriculture, School of Agriculture, Policy and Development, The University of Reading, UK. Journal of Zhejiang University SCIENCE. 6B(3):155-157.

Dabiré, K; Mateille, T. 2004. Soil texture and irrigation influence the transport and the development of *Pasteuria penetrans*, a bacterial parasite of rootknot nematodes. Soil Biology & Biochemistry (36): 539- 543.

Davide, R G. 1996 .Overview of nematodes as a limiting factor in Musaproduction . In New Frontiers in Resistance Breeding for Nematode, *Fusarium* and Sigatoka (1995, Kuala Lumpur, Malaysia). Proceedings. Frison , EA ; Horry, J P ; De Waele, D. E d s. Kuala Lumpur, Malaysia ,IPGRI - INIBA P.p 27-31.

Davies, K.G., B.R. Kerry, and C.A. Flynn. 1988a. Observations on the pathogenicity of *Pasteuria penetrans*, a parasite of root-knot nematodes. *Annals of Applied Biology* (112):491-501.

Dorel, M ; Besson, N. 1996. Utilization d engrais organiques en culture bananière. CIRAD FLHOR Fort de France 27.p.

Duan, Y; Castro, H; Hewlett, T; White, J. 2003. Detection and characterization of *Pasteuria* 16S rRNA gene sequences from nematodes and soils. Soil and Water Science Department¹, and Microbiology and Cell Science Department³, University of Florida, Gainesville, FL 32611-0290, USA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2003) 53: 105–112

Esquivel, A. 2011. *Radopholus similis*, Nematodo barrenador. Biodiversidad de Costa Rica. INBIO. San Jose, Costa Rica.

FAO (Food and Agricultural Organization of the United Nations, IT). 2014. Market Review and Banana Statistics 2012-2013. Intergovernmental Group of Tropical Fruits. Roma. 33p.

Fischbein, D. 2012. Introducción a la teoría del control biológico de plagas. Serie técnica; Manejo integrado de plagas forestales. Laboratorio de entomología de insectos. EEA INTA Bariloche. San Carlos de Bariloche. Río Negro. Argentina.

Fogain, R. 2000.Effect of *Radopholus similis* on plant growth and yield of plantains (*Musa*, AAB). *Nematology* 2(2), 129-133

Freitas LG, Dickson DW, Mitchell DJ, McSorley R. 2000 Suppression of *Meloidogyne arenaria* by *Pasteuria penetrans* in the field. *Nematol Bras.* ;24:147-156.

Gómez, L; Enrique , R; Rodríguez, M; Ramos, O; Gandarilla, H. 2012. Detección de *Pasteuria penetrans* (Thorne) Sayre y Starr en la región occidental de Cuba. Laboratorio de Nematología Agrícola. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). San José de las Lajas, Mayabeque. Cuba. *Rev. Protección Veg.* (27) 3: 162-166

Gómez, L; Gandarilla, H; Rodríguez, M. 2010. *Pasteuria penetrans* como agente de control biológico de *Meloidogyne* spp. *Revista Protección Vegetal* 25(3).

Gonzaga, V; Santos, JM. 2009. Detection of *Pasteuria thornei* in *Pratylenchus Brachyurus* and *P. zaeae*. *Nematologia Brasileira*, Brasil. 33 (1). pp.103-105

Gowen, S.; Quénéhervé, P.; y Fogain, R. (2005). Chapter 16: Nematodes parasites of bananas and plantains. En Luc, M. Sikora, J., y J. Bridge (eds.), *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*. pp. 611-643.

Guzmán, O; Castaño, J; VillegasB. 2012. EFECTO DE LA LIMPIEZA SANITARIA DE CORMOS DE PLÁTANO (*Musa AAB SIMMONDS*) SOBRE NEMATODOS FITOPARÁSITOS. Programa de Maestría en Fitopatología. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Caldas. 15(1): 87 – 95.

Guzmán, O. 2011. El nematodo barrenador (*Radopholus similis*) Cobb del banano y plátano. *Manizales*. Consultado: No. 33, Luna Azul ISSN 1909-2474. Disponible en:

<http://lunazul.ucaldas.edu.co/index.php?option=content&task=view&id=656>

Hatz, B, Dickson, D. 1992. Effect of Temperature on Attachment, Development, and Interactions of *Pasteuria penetrans* on *Meloidogyne arenaria*. Journal of Nematology 24(4):512-521.

Hernández, J. 2010. Análisis de la diversidad genética de *Ralstonia solanacearum* y su relación con la virulencia en Plátano, Amenaza en Venezuela. Universidad Nacional Experimental Sur del Lago. Laboratorio de biotecnología GIBA, Santa Bárbara de Zulia-Venezuela. 3 (1): 19-30

Hewlett, T; Serracin, M. 1999. *Pasteuria* spp. Agente de control biológico de nematodos fitoparásitos. Manual de técnicas. CORBANA 21(46): 151-161.

Hidalgo, M; Tapia, A; Rodríguez, W; Serrano, E. 2006. Efecto de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) sobre la fotosíntesis y transpiración foliar del banano (*Musa* sp. AAA, cv. Valery). Agronomía costarricense 30(1):35-41. Ministerio de Agricultura y Ganadería.

Ibarra, J; Galindo, E; Patiño, M; Serrano, L; García, R. 2006. Los microorganismos en el control biológico de insectos y Fito patógenos. Revista Latinoamericana de Microbiología 48 (2): 113-120

Isurita, J. 2009. Population dynamics of *Pasteuria penetrans* in a peanut field and description of a *Pasteuria* ISOLATE INFECTING *Mesocriconema ornatum*. Tesis UNIVERSITY OF FLORIDA.

Jaizme, M; Rodríguez, A. 2008. Integración de microorganismos benéficos (Hongos micorrícicos y Bacterias rizosféricas) en agro sistemas de las islas canarias.

Jonathan, E; Barker, K; Abdel-Alim, F; Vrain, T, Dickson, D. 2000. BIOLOGICAL CONTROL OF MELOIDOGYNE INCOGNITA ON TOMATO AND BANANA WITH RHIZOBACTERIA, ACTINOMYCETES, AND PASTEURIA PENETRANS. *Nematropica* 30:2.

Kaplan, D. 1994. Molecular characterization of the burrowing nematode sibling species, *Radopholus citrophilus* and *R. similis*. In *Advances in Molecular Plant Nematology*. Lamber75 t i, F; De Giorgi, C; McK Bird,D. E d .New Yo r k , Plenum Press.p. 7 7 - 8 3.

Lacey, L; Horton, D; Unruh, T; Pike, K; Márquez, M. 2001. Control biológico de papas en norte América (en línea). USDA-ARS, Yakima Agricultural Research Laboratory. Consultado el 25 del 12 del 2014. Disponible en: <http://aenews.wsu.edu/May01AENews/SpanishPotato.html>

Lara, D. 2009. Tesis: Uso de bacterias endofíticas para el control biológico del Mal de Panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) en el cultivar Gros Michel (AAA). Tesis CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA. Escuela de posgrado. CATIE, Costa Rica.

Manzo, G; Guzmán, S; Rodríguez, C; James, A; Orozco, M. 2005. Biología de *Mycosphaella fijiensis* Morelet y su interacción con *Musa* spp. *Revista mexicana de fitopatología* 23 (1): 87-96.

Marín, D; Sutton, T; Barker, K. 2002. Diseminación del banano en Latinoamérica y el Caribe y su relación con la presencia de *Radopholus similis*. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)* no. 66: 6 2 - 7 5.

Martínez, I; Guzmán, M. 2011. Moko o marchitamiento bacteriano del banano y plátano (*Ralstonia solanacearum*). Proyecto demostrativo con implementación de bpa en el cultivo del banano. CORBANA S.A.

Martínez, I; Villalta, R; Soto, E; Murillo, G; Guzmán, M. 2011. Manejo de la Sigatoka negra en el cultivo del banano. Proyecto demostrativo con implementación de BPA en el cultivo del banano. Dirección de investigaciones y sección de fitopatología, CORBANA.

Martínez, L. 2013. Moko bacteriano del plátano *Ralstonia solanacearum* raza 2. Servicio Nacional de Sanidad Vegetal. Centro Nacional de referencia fitosanitaria.

Martinuz, A; Navarro, G; Pocasangre, L; Quiró, L. 2010. Análisis técnico y económico de tecnologías alternativas para el bio-control del nematodo barrenador del banano (*Radopholus similis* (COBB)): El caso de la empresa agro comercial EARTH. Universidad EARTH. Tierra Tropical 6 (1): 1-22

Mauchline, T; Mohan, S; Davies, K; Schaff, J; Opperman, C; Kerry, B; Hirsch, P. 2010. A method for release and multiple strand amplification of small quantities of DNA from endospores of the fastidious bacterium *Pasteuria penetrans*. Letters in Applied Microbiology ISSN 0266-8254

Meneses, A. 2003. Tesis: Utilización de hongos endófitos provenientes de banano orgánico para el control biológico del nemátodo barrenador *Radopholus similis* Cobb, Thorne. Tesis. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza Programa de educación para el desarrollo y la conservación. Turrialba. Costa Rica.

Moens, T. Araya, M. Swennen, R. 2003. Biodegradación acelerada de nematicidas en Musa. In Rivas, G. y Rosales, F. eds. Actas taller "Manejo Convencional y Alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas en los trópicos" Guayaquil, Ecuador. p.105-118.

Mohan, S; Mauchline, T; Rowe, J; Hirsch, P; Davies, K. 2011. *Pasteuria* endospores from *Heterodera cajani* (Nematoda: Heteroderidae) exhibit inverted

attachment and altered germination in cross-infection studies with *Globodera pallid* (Nematoda: Heteroderidae)

Morales, R. 2006. Tesis: Manejo de nematodos fitoparasíticos utilizando productos naturales y biológicos. Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de Maestro en Ciencias en Protección de Cultivos. Universidad de Puerto Rico.

Nicholls, C. 2008. Control biológico de insectos: Un enfoque agroecológico. Ciencia y tecnología. Editorial Universidad de Asntioquia. Medellín, Colombia. 278p

Nong, G; Chow, V; Schmidt, L; Dickson, D; Preston, J. 2007. Multiple-strand displacement and identification of single nucleotide polymorphisms as markers of genotypic variation of *Pasteuria penetrans* biotypes infecting root-knot nematodes. FEMS Microbiol Ecol (61) 327–336

Oostendorp M, Dickson DW, Mitchell DJ. 1990. Host range and ecology of isolates of *Pasteuria* spp. from the southeastern United States. Nematología 22 :525-531.

Pérez, C; Chamorro, A. 2012. Bacterias endofíticas: Una alternativa biológica para el control de *Burkholderia glumae* en el cultivo del arroz en Colombia. Rev. Colombiana cienc. Anim. 4(1):172-184.

Perry, R., y Moens, M. (2006). *Plant nematology*. London: CAB International. 447p.

Piedra, R. 2008. Manejo biológico de nematodos fitoparásitos con hongos y bacterias. Manejo biológico de nematodos fitoparásitos con hongos y bacterias. Tecnología en Marcha 21(1): 123-132

Pocasangre LE.; Menjívar, RD.; zum Felde, A.; Riveros, AS., Rosales, FE.; Sikora, RA. 2006. Hongos endofíticos como agentes biológicos de control de fitonemátodos en banano. In XVII Reunião Internacional da Associação para a

Coperação nas Pesquisas sobre Banana no Caribe e na América Tropical. ACORBAT. Joinville, Santa Catarina, Brasil. p.249-254.

Quénéhervé, P. 2009. Integrated management of banana nematodes. pp.3-61. En Ciancio, A. and K.G. Mukerji (eds). Integrated management of fruit crops and forest nematodes. Springer, Martinique, France.

Ramírez, D. 2010. Bacterias endofíticas aisladas de fresa (*Fragaria x ananassa* Dutch.) y su impacto sobre plantas de interés agrícola. Tesis. Escuela Nacional de Ciencia Biológicas. Sección de estudios de posgrado e investigación Departamento de Microbiología. México D.F.

Rodríguez, A. 2014. Evaluación del efecto de cepas nativas de *bacillus* sp, aisladas de un suelo supresivo a nematodos, sobre el nematodo barrenador banano, *Radopholus similis* (thorne), y el crecimiento de plantas de banano (*Musa* AAA) bajo condiciones de vivero. Tesis. Msc. Cartago, Costa Rica. Área Académica Agroforestal Programa de Maestría en Gestión de Recursos Naturales y Tecnologías de Producción. Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Rodríguez, R. 1991. Control biológico de nematodos parásitos de plantas. Departamento de Patología de plantas, Universidad de Auburn. Estación experimental agrícola de Alabama. Nematropica. 21(1)

Rodríguez, M. 2012. Mal de panamá: Medidas de control y prevención. Servicio Técnico de Agricultura y desarrollo Rural. Tenerife Islas Canarias.

Rodríguez, A; Guillén, C; Valle, H; Uva, V; Segura, R; Laprade, S; Sandoval, J. 2010. Aspectos a considerar sobre el control biológico. Proyecto demostrativo con Implementación de Buenas prácticas Agrícolas (BPA) EN EL CULTIVO DEL BANANO. Dirección de Investigaciones. Centro de control biológico. CORBANA, Costa Rica, La Rita de Guápiles.

Rodríguez, A; Muñoz, Y; Pocasangre, L. 2012. Evaluación de nematodos de vida libre como indicadores de calidad y salud de suelo en tres sistemas de producción de banano. Universidad EARTH Guácimo, Limón, Costa Rica. *Tierra tropical* 8 (1): 115-125.

Rojas, C. 2011. Prospección de la entomofauna benéfica asociada al cultivo de banano (*Musa AAA*), subgrupo “cavendish,” en la región atlántica de costa rica. Tesis, Cartago Costa Rica. Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Rojas, T; Marbán N. 1999. *Pasteuria penetrans*: Adherencia y parasitismo en *Meloidogyne incognita* y *Meloidogyne arabicida*. Laboratorio de nematología, CATIE, Turrialba. Costa Rica. *Nematropica* 29: 233-240.

Romero, R.A. 2003. The spread, detection and impact of black leaf streak disease and other *Mycosphaerella* species in the 1990s, pp. 21- 47. In: Jacome L; Lepoivre P; Marin D; Ortiz R; Romero R; Escalant JV (eds.). *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. Proceedings of the 2nd International Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases held in San José, Costa Rica, 20-23 Mayo 2002. INIBAP, Roma.

Salazar, J. 2012. Evaluación de métodos de manejo de nematodos fitoparásitos en plátano (*Musa AAB*) DOMINICO HARTÓN. *Agronomía*: 20(1): 51 – 63

Salgado, I; Durán, C; Cruz, M; Carballo, E; Martínez, A. 2012. Bacterias rizosféricas con potencialidades fisiológicas para eliminar materia orgánica de aguas residuales. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 28 (1) 17-26

Sánchez, R; Sánchez, B; Sandoval, Y; Ulloa, A; Armendáriz, B; García, M; Macías, M. 2013. Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 16(2):132-146.

Sarah, J; Pinochet, J; Stanton, J. 1996. El nematodo barrenador del banano *Radopholus similis* Cobb. Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y el Plátano Parc Scientifique Agropolis II34397 Montpellier Cedex 5, FRANCIA.

Sayre, RM; Starr, MP; Golden, AM; Wergin, WP, Endo, BY. 1988. Comparison of *Pasteuria penetrans* from *Meloidogyne incognita* with a Related Mycelial and endospore-forming bacterial parasite from *Pratylenchus brachyurus*. The Helminthological Society of Washington.55(1), pp 28-49.

Schmid, L; Mouton, L; Nong, G; Ebert, D; Preston, J. 2008. Genetic and Immunological Comparison of the Cladoceran Parasite *Pasteuria ramosa* with the Nematode Parasite *Pasteuria penetrans*. Journal APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY 74 (1).

Schmid, L; Preston, J; Nong, G; Dickson, D; Aldrich, H. 2004. Detection of *Pasteuria penetrans* infection in *Meloidogyne arenaria* race 1 in planta by polymerase chain reaction. FEMS Microbiology Ecology 48 (2004) 457–464. Department of Microbiology.

Sharmila, R; Kumar, S; Ramakrishnan, S. 2012. Parasiting ability of *Pasteuria penetrans* on phytonematodes. JBiopest 5: 33-35.

Siddiqi, M. R. (2000). *Tylenchida: Parasites of plants and insects*. 2nd edition. CABI Bookshop. 834p

Siddiqui, Z; Mahmood, I. 1998. Role of bacteria in the management of plant parasitic nematodes: A review. Departamento de botánica. Universidad Aligarh Muslim. India.

Stanton, J.M.1994.Status of nematode and weevil borer affecting banana in Australia. *In* Banana nematode and weevil borers in Asia and the Pacific (1994,

Serdang Selangor, Malaysia). Ed. Valmayor, R; Davide, RG; Stanton, JM; Treverrow, NL; Roa, VN. Los Baños, Philippines, INIBAPASPNET. p. 48-56.

Stragier, P. Bonamy, C. Campelli, C. 1988. Processing of a sporulation sigma factor in *Bacillus subtilis*: How morphological structure could control gene expression. Volume 52, Issue 5, 11 March 1988, Pages 697–704

Sturhan, D; Shutova, t; Akimov, V; Subbotin, S. 2005. Occurrence, hosts, morphology, and molecular characterization of *Pasteuria* bacteria parasitic in nematodes of the family Plectidae. Institut für Nematologie und Wirbeltierkunde, Topphaideweg 88, 48161 Münster, Germany. Journal Invertebrate Pathology.

Talavera, M; Mizukubo, T. 2003. Influence of soil conditions, spore densities and nematode age on *Pasteuria penetrans* attachment to *Meloidogyne incognita*. Mallorca. España. Spanish Journal of Agricultural Research 1 (4): 57-63.

Tanimola, AA.; Asimeaa, AO.; Orufu-Joseph, S. 2013. Status of Plant-parasitic Nematodes on Plantain (*Musa paradisiaca* (L.)) in Choba, Rivers State, Nigeria. World Journal of Agricultural Sciences 9(2): 189-195.

Tateishi, Y; Sano, Zen-ichi, Iwahori, H. 2007. Emergence of suppression of root-knot nematodes in sweet potato cropping systems treated with *Pasteuria penetrans*. Japanese Journal of Nematology 37 (1).

Tian, B.; Yang, J.; Zhang KQ. 2007. Bacteria used in biological control of plant-parasitic nematodes: populations, mechanisms of action, and future prospects. FEMS Microbial Ecology 61: 197-213.

Tropical fruits trading. 2011. Historia del banano. Fruta de muchos años de historia. (En línea). Consultado el 22 de agosto del 2013. Disponible en: http://www.tropicfruitstrading.com/?page_id=153

- Trotter, J; Bishop, A. 2003. Phylogenetic analysis and confirmation of the endospore-forming nature of *Pasteuria penetrans* based on the *spo0A* gene. *FEMS Microbiology Letters* (225). 249-256.
- Van Driesche, R; Hoddle, M; Center, T. 2007. Control de plagas y malezas por enemigos naturales. Forest Health Technology Enterprise Team. 751p.
- Van Gundy SD. 1985. Ecology of *Meloidogyne* spp.: emphasis on environment factors affecting survival and pathogenicity. En: Barker KR, Carter CC, Sasser JN. (Eds.). *An Advanced Treatise on Meloidogyne*. Vol. I. Biology and Control. IMP, North Carolina State University Graphics, USA; p. 177-182.
- Verdejo, S; Jaffee, A. 1988. Reproduction of *Pasteuria penetrans* in a Tissue-Culture System Containing *Meloidogyne javanica* and *Agrobacterium rhizogenes*-Transformed Roots. Department of Nematology, University of California.
- Zum Felde, A.; Pocasangre, L. y Sikora, R. 2003. The potential use of microbial communities inside suppressive banana plants for banana root protection. In Turner, D y Rosales, F. *Banana Root System: towards a better understanding for its productive management, San José, 2003*. Montpellier (FR) : INIBAP; San José (CR) : MUSALAC; CORBANA. p. 169-177.
- Zhang, Y; Hu, J; Dong, F; Liu, X; Wu; X. 2014. Response of microbial community to a new fungicide fluopyram in the silty-loam agricultural soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 108. 273-280.
- Zwart, M.A; Rojo, J.M; De la Cruz, R ; Yeomans, J. 2005. Coberturas y la salud del suelo. Universidad EARTH. Guácimo. Limón. Costa Rica. *Tierra Tropical* 1(1):9-20.

11. Anexos.

Anexo 1. Informes nematológicos de las fincas muestreadas

Cuadro 23. Informe de análisis nematológico Finca Cartagena. Contenido raíces (g) por planta y número de nematodos por 100 g de raíces.

No.	Cable	Plantas/ muestra	<i>R. similis</i>	<i>Helicotylenchus</i>	<i>Meloidogyn e</i>	<i>Pratylenchu s</i>	NTOTALES	RF	RNF	RTOTAL
Muestra	Identific.									
M1	C12	7	19200	10800	0	0	30000	29	5	34
M2	C11	7	2400	11600	400	0	14400	11	1	12
M3	C24	7	0	400	2400	0	2800	17	5	22
M4	C25	7	0	800	3600	0	4400	26	5	31
	Promedio		5.400	5.900	1.600	0	12.900	21	4	25
	Máximo		19.200	11.600	3.600	0	30.000	29	5	34
	Mínimo		0	400	0	0	2.800	11	1	12

Cuadro 24. Informe de análisis nematológico Finca Rebusca. Contenido raíces (g) por planta y número de nematodos por 100 g de raíces.

No.	Cable	Plantas/ muestra	<i>R. similis</i>	<i>Helicotylenchus</i>	<i>Meloidogyn e</i>	<i>Pratylenchu s</i>	NTOTALES	RF	RNF	RTOTAL
Muestra	Identific.									
M1	C-23-T iz	1	19200	5200	0	0	24400	40	5	45
M2	C-23-TD	1	32400	5600	0	0	38000	38	11	49
M3	C-23-T iz	1	12400	8400	0	800	21600	35	14	49
M4	C-24-TD	1	60800	5600	0	800	67200	55	10	65
M5	C-25-TD	1	45200	4400	0	0	49600	90	1	91
	Promedio		34.000	5.840	0	320	40.160	52	8	60
	Máximo		60.800	8.400	0	800	67.200	90	14	91
	Mínimo		12.400	4.400	0	0	21.600	35	1	45

Cuadro 25. Informe de análisis nematológico Finca Duacari 2. Contenido raíces (g) por planta y número de nematodos por 100 g de raíces.

No.	Cable	Plantas/ muestra	<i>R. similis</i>	<i>Helicotylenchus</i>	<i>Meloidogyn e</i>	<i>Pratylenchu s</i>	NTOTALES	RF	RNF	RTOTAL
Muestra	Identific.									
1	1-TD-T47	Peso Tot.	38400	2800	0	0	41200	25	3	28
2	2-TI-T47	Peso Tot.	11.600	1.800	0	2.000	15400	31	9	40
3	3-TD-T59	Peso Tot.	16.000	8.400	0	0	24400	34	3	37
4	4-TI-T59	Peso Tot.	1.200	6.800	1.600	1.200	10800	31	4	35
5	5-TD-T43	Peso Tot.	1.600	5.600	0	2.000	9200	26	5	31
	Promedio		13.760	5.080	320	1.040	20.200	29	5	34
	Máximo		38.400	8.400	1.600	2.000	41.200	34	9	40
	Mínimo		1.200	1.800	0	0	9.200	25	3	28

Cuadro 26. Informe de análisis nematológico Finca Platanera Sixaola. Contenido raíces (g) por planta y número de nematodos por 100 g de raíces.

No.	Cable	Plantas/ muestra	<i>R. similis</i>	<i>Helicotylenchus</i>	<i>Meloidogyn e</i>	<i>Pratylenchu s</i>	NTOTALES	RF	RNF	RTOTAL
Muestra	Identific.									
1	M1-C37-TIZ	3	8400	11600	0	0	20000	12	1	13
2	M2-C45-TD	3	400	2.400	0	0	2800	13	1	14
3	M3-C48-TIZ	3	20.400	8.000	0	0	28400	15	0	15
4	M4-C8-TIZ	3	8.800	8.800	0	0	17600	17	0	17
5	M5-C25-TD	3	1.200	1.600	1.200	0	4000	12	1	13
6	M7-Lucia Lopez Ramirez	3	6.400	1.600	0	0	8000	9	0	9
7	M8-Dulcelina Roes M	3	22.000	3.200	0	0	25200	9	3	12
8	M9-Maricela Fernandez F	3	400	2.000	0	0	2400	13	1	14
	Promedio		8.500	4.900	150	0	13.550	13	1	13
	Máximo		22.000	11.600	1.200	0	28.400	17	3	17
	Mínimo		400	1.600	0	0	2.400	9	0	9

Cuadro 27. Informe de análisis nematológico Finca San Pablo. Contenido raíces (g) por planta y número de nematodos por 100 g de raíces.

No.	Cable	Plantas/ muestra	<i>R. similis</i>	<i>Helicotylenchus</i>	<i>Meloidogyn</i> <i>e</i>	<i>Pratylenchu</i> <i>s</i>	NTOTALES	RF	RNF	RTOTAL
Muestra	Identific.									
1	M1	3	28400	2800	0	0	31200	9	0	9
2	M2	3	18.400	0	0	0	18400	13	0	13
3	M3	3	50.400	800	400	0	51600	11	0	11
4	M4	3	11.000	1.200	0	0	12200	16	1	17
5	M5	3	24.400	2.800	0	0	27200	16	0	16
6	M6	3	32.000	2.000	400	0	34400	10	0	10
	Promedio		27.433	1.600	133	0	29.167	13	0	13
	Máximo		50.400	2.800	400	0	51.600	16	1	17
	Mínimo		11.000	0	0	0	12.200	9	0	9

Cuadro 28. Informe de análisis nematológico Finca 28 Millas. Contenido raíces (g) por planta y número de nematodos por 100 g de raíces.

No.	Cable	Plantas/ muestra	<i>R. similis</i>	<i>Helicotylenchus</i>	<i>Meloidogyn</i> <i>e</i>	<i>Pratylenchu</i> <i>s</i>	NTOTALES	RF	RNF	RTOTAL
Muestra	Identific.									
1	M9	4	1600	0	0	0	1600	12	0	12
	Promedio		1.600	0	0	0	1.600	12	0	12
	Máximo		1.600	0	0	0	1.600	12	0	12
	Mínimo		1.600	0	0	0	1.600	12	0	12

Anexo 2. Análisis físico y químico de las muestras de suelo de las fincas muestreadas

Cuadro 29. Análisis textura del suelo finca San Pablo

Identificación de la muestra	%			Nombre textural	Observaciones
	Arena	Arcilla	Limo		
M-1 C-4 S TI SER	35,0	17,0	48,0	Franco	PINTA BLANCA, TORRE 5
M-2 C-5 S TI SER	42,0	22,0	36,0	Franco	PINTA BLANCA
M-3 C-7 N TD SER	60,0	14,0	26,0	Franco arenoso	PINTA BLANCA, TORRE 9
M-4 C-11 E TD SER	57,0	14,0	28,0	Franco arenoso	PINTA AMARILLA, TORRE 23
M-5 C-29 N TI SER	52,0	27,0	21,0	Franco arcillo arenoso	PINTA VERDE, TORRE 7
M-6 C-22 N TD SER	40,0	17,0	43,0	Franco	PINTA VERDE, TORRE 9
M-7 BOSQUE 28 MILLAS	48,0	17,0	35,0	Franco	PUNTE COLGANTE
M-8 BOSQUE 28 MILLAS	51,0	19,0	30,0	Franco	FONDO
M-9-28 MILLAS SER	53,0	19,0	28,0	Franco arenoso	PLATANO ABANDONO

Cuadro 30. Análisis químico del suelo finca San Pablo

Identificación de la muestra	pH	Acidez	cmol(+)/L			mg/L			%			Observaciones
			Ca	Mg	K	P	Fe	Cu	Zn	Mn	M.O	
M-1 C-4 S TI SER	6.14	0.04	30.50	9.32	1.06	62	336	13.8	16.1	2.5	2.5	PINTA BLANCA, TORRE 5
M-2 C-5 S TI SER	5.80	0.26	24.90	6.82	0.82	74	271	9.2	12.9	2.6	2.6	PINTA BLANCA
M-3 C-7 N TD SER	5.90	0.10	24.30	8.39	1.42	59	262	6.6	8.0	1.5	1.5	PINTA BLANCA, TORRE 9
M-4 C-11 E TD SER	5.60	0.14	29.30	5.96	2.67	196	260	6.3	22.1	2.0	2.0	PINTA AMARILLA, TORRE 23
M-5 C-29 N TI SER	5.68	0.08	27.30	7.99	0.94	52	320	10.5	10.0	2.8	2.8	PINTA VERDE, TORRE 7
M-6 C-22 N TD SER	6.28	0.07	30.80	7.78	1.14	61	209	9.2	11.6	1.9	1.9	PINTA VERDE, TORRE 9
M-7 BOSQUE 28 MILLAS	5.94	0.14	23.20	8.43	0.29	32	231	6.3	2.9	4.4	4.4	PUNTE COLGANTE
M-8 BOSQUE 28 MILLAS	6.05	0.09	21.70	9.48	0.15	17	256	7.7	2.1	2.8	2.8	FONDO
M-9-28 MILLAS SER	6.16	0.29	22.00	9.88	1.14	37	218	6.1	2.4	2.3	2.3	PLATANO ABANDONO

Cuadro 31. Análisis textura del suelo finca Platanera Rio sixaola

Identificación de la muestra	%			Nombre textural	Observaciones
	Arena	Arcilla	Limo		
M-1-SER-C37-TI	30.0	18.0	52.0	Franco limoso	
M-2-SER-C45-TD	42.0	10.0	48.0	Franco	
M-3-SER-C48-TI	40.0	25.0	35.0	Franco	
M-4-SER-C8-TI	37.0	0 23.0	40.0	Franco	
M-5-SER-C25-TD	47.0	10.0	43.0	Franco	
M-6-BOSQUE	57.0	18.0	25.0	Franco arenoso	
M-7-SER-PLATANO CURRA	55.0	13.0	33.0	Franco arenoso	LUCIA LOPEZ RAMIREZ
M-8-SER-PLATANO	47.0	13.0	40.0	Franco	DULCINEA PAES MAYORGA
M-9-SER-GROSS MICHEL	87.0	3.0	10.0	Arenoso	MARICELA FERNANDEZ FERNANDEZ

Cuadro 32. Análisis químico del suelo finca Platanera

Identificación de la muestra	pH	Acidez	cmol(+)/L			mg/L			%			Observaciones
			Ca	Mg	K	P	Fe	Cu	Zn	Mn	M.O	
M-1-SER-C37-TI	5.45	1.01	17.40	4.16	0.83	44	301	7.5	5.4	58	2.6	
M-2-SER-C45-TD	6.46	0.07	20.60	4.85	0.74	30	252	8.6	2.1	68	2.0	
M-3-SER-C48-TI	4.91	1.05	21.30	8.31	1.70	116	339	11.0	33.1	78	3.7	
M-4-SER-C8-TI	5.66	0.19	19.70	5.93	0.53	25	277	9.4	8.1	52	2.7	
M-5-SER-C25-TD	6.00	0.13	18.60	4.23	0.49	21	256	6.4	1.7	59	1.6	
M-6-BOSQUE	6.71	0.03	32.00	10.30	0.97	17	225	6.1	3.1	117	3.0	
M-7-SER-PLATANO CURRA	6.25	0.05	29.90	5.22	0.40	39	296	6.0	3.2	69	2.0	LUCIA LOPEZ RAMIREZ
M-8-SER-PLATANO	6.30	0.05	19.80	4.58	0.82	19	292	8.9	1.6	87	1.6	DULCINEA PAES MAYORGA
M-9-SER-GROSS MICHEL	6.28	0.11	22.40	3.56	0.23	37	177	5.8	1.2	26	1.4	MARICELA FERNANDEZ FERNANDEZ

Cuadro 33. Análisis textura del suelo finca Cartagena

Identificación de la muestra	%			Nombre textural
	Arena	Arcilla	Limo	
M-BOSQUE M-3 N-1	64.0	11.0	25.0	Franco arenoso
S-E-R C-11 M-2	54.0	16.0	30.0	Franco arenoso
S-E-R C-12-M-1	71.0	11.0	18.0	Franco arenoso
S-E-R C-24 M-4	71.0	8.0	21.0	Franco arenoso
S-E-R C-25 M-5	78.0	6.0	16.0	Arenoso franco

Cuadro 34. Análisis químico del suelo finca Cartagena

Identificación de la muestra	pH	Acidez	cmol(+)/L			mg/L		Cu	Zn	Mn	%	
			Ca	Mg	K	P	Fe				M.O	
M-BOSQUE M-3 N-1	6.30	0.05	12.10	4.34	0.37	8	87	3.4	2.7	24	11.6	
S-R C11 M-2	5.92	0.04	9.32	2.19	0.85	44	115	3.3	8.4	25	5.2	
S-E-R C-11 M-2	6.42	0.04	8.47	1.98	0.77	28	106	2.6	5.2	16	3.9	
S-R C-12 M-1	6.22	0.03	10.20	1.72	1.20	61	87	3.1	19.2	33	6.0	
S-E-R C-12 M-1	6.29	0.04	7.94	1.33	0.93	27	73	2.3	6.5	12	4.6	
S-R C-24 M-4	5.25	0.60	2.45	0.97	1.15	24	101	2.8	8.7	57	5.2	
S-E-R C-24 M-4	5.36	0.37	4.46	1.10	0.54	9	97	2.1	2.7	16	3.4	
S-R C-25 M-5	5.88	0.11	4.74	0.67	0.86	12	65	1.7	8.1	14	5.4	
S-E-R C-25 M-5	5.89	0.09	4.26	0.57	0.46	7	63	1.5	7.0	10	5.6	

Cuadro 35. Análisis textura del suelo finca Rebusca

Identificación de la muestra	%			Nombre textural
	Arena	Arcilla	Limo	
SER-M1-C23-TI	34.0	33.0	33.0	Franco arcilloso
SER-M2-C23-TD	27.0	35.0	38.0	Franco arcilloso
SER-M3-C23-TI	37.0	28.0	36.0	Franco arcilloso
SER-M5-C25-TD	32.0	25.0	43.0	Franco
BOSQUE-M6	52.0	10.0	38.0	Franco
SER-M9-C24-TD	42.0	25.0	33.0	Franco

Cuadro 36. Análisis químico del suelo finca Rebusca

Identificación de la muestra	pH	Acidez	cmol(+)/L			mg/L		Cu	Zn	Mn	%	
			Ca	Mg	K	P	Fe				M.O	
SER-M1-C23-TI	6.15	0.02	17.40	4.20	2.49	83	277	11.5	9.2	18	4.7	
SER-M2-C23-TD	5.90	0.02	15.30	4.42	1.34	61	299	13.3	9.6	23	3.9	
SER-M3-C23-TI	5.40	0.10	13.00	5.61	1.57	95	314	11.4	7.7	23	3.9	
SER-M5-C25-TD	6.75	0.00	24.00	5.91	1.17	177	338	18.7	27.0	23	3.9	
BOSQUE-M6	6.19	0.04	12.00	4.42	0.83	40	147	6.5	5.9	16	2.7	
SER-M9-C24-TD	6.11	0.04	11.20	4.33	0.79	33	133	5.8	4.8	14	2.8	

Cuadro 37. Análisis textura del suelo finca Duacarí 2

Identificación de la muestra	%			Nombre textural	Observación
	Arena	Arcilla	Limo		
SER-1	47.0	30.0	23.0	Franco arcillo arenoso	T-47/TD
SER-2	42.0	30.0	28.0	Franco arcilloso	T-47/TI
SER-3	57.0	25.0	18.0	Franco arcillo arenoso	T-59/TD
SER-4	55.0	20.0	25.0	Franco arcillo arenoso	T-59/TI
SER-5	57.0	23.0	20.0	Franco arcillo arenoso	T-43/TD

Cuadro 38. Análisis químico del suelo finca Duacarí 2

Id de la muestra	-	cmol(+)/L				mg/L					%
	pH	Acid	Ca	Mg	K	P	Fe	Cu	Zn	Mn	M.O
SER-1	5,48	0,15	10,90	4,09	0,69	32	173	4,1	3,3	71	4,4
SER-2	5,23	0,45	11,60	4,36	0,91	28	196	5,1	3,4	79	4,3
SER-3	5,27	0,53	9,07	2,88	0,46	25	137	3,9	2,2	62	3,2
SER-4	5,60	0,13	9,43	2,25	0,87	20	99	3,6	2,5	38	6
SER-5	5,64	0,10	11,20	2,62	1,22	56	212	5,1	3,0	56	4,7

Anexo 3. Muestras analizadas en el laboratorio de Biología Molecular.

Se realizó extracción de ADN en muestras frescas de Suelo extra rizosférico, Suelo rizosférico y Raíz.

Cuadro 39. Extracción de ADN en muestras frescas de Suelo extra rizosférico, Suelo rizosférico y Raíz de la finca Cartagena.

Id	Id Usuario	Id BM	Tipo de muestra	Finca	Cable	Detección
1	M1SER	1-44	Suelo extra rizosférico	Cartagena	12	Negativa
2	M1SR	1-45	Suelo rizosférico	Cartagena	12	Negativa
3	M1R	1-46	Raíz	Cartagena	12	Negativa
4	M2SER	1-47	Suelo extra rizosférico	Cartagena	11	Negativa
5	M2SR	1-48	Suelo rizosférico	Cartagena	11	Negativa
6	M2R	1-49	Raíz	Cartagena	11	Negativa
7	M4SER	1-50	Suelo extra rizosférico	Cartagena	24	Negativa

8	M4SR	1-51	Suelo rizosférico	Cartagena	24	Negativa
9	M4R	1-52	Raíz	Cartagena	24	Negativa
10	M5SER	1-53	Suelo extra rizosférico	Cartagena	25	Negativa
11	M5SR	1-54	Suelo rizosférico	Cartagena	25	Negativa
12	M5R	1-55	Raíz	Cartagena	25	Positiva
13	M3 suelo	1-56	Bosque	Cartagena	-	Negativa
14	M3 suelo	1-57	Bosque	Cartagena	-	Negativa
15	M3 suelo	1-58	Bosque	Cartagena	-	Negativa
16	M3 suelo	1-59	Bosque	Cartagena	-	Negativa
17	M3 suelo	1-60	Bosque	Cartagena	-	Negativa

Cuadro 40. Extracción de ADN en muestras frescas de Suelo extra rizosférico, Suelo rizosférico y Raíz de la finca Cartagena.

Id	Id Usuario	Id BM	Tipo de muestra	Finca	Cable	Detección
1	M1SER	6-1	Suelo extra rizosférico	Cartagena	25	Negativa
2	M1SR	6-2	Suelo rizosférico	Cartagena	25	Negativa
3	M1R	6-3	Raíz	Cartagena	25	Negativa
4	M1.1R	6-4	Raíz	Cartagena	25	Negativa
5	M1.2R	6-5	Raíz	Cartagena	25	Positiva
6	M1.3R	6-6	Raíz	Cartagena	25	Positiva
7	M2SER	6-7	Suelo extra rizosférico	Cartagena	24	Negativa
8	M2SR	6-8	Suelo rizosférico	Cartagena	24	Negativa
9	M2R	6-9	Raíz	Cartagena	24	Negativa
10	M2.1R	6-10	Raíz	Cartagena	24	Negativa
11	M3SER	6-11	Suelo extra rizosférico	Cartagena	24	Negativa
12	M3SR	6-12	Suelo rizosférico	Cartagena	24	Negativa
13	M3R	6-13	Raíz	Cartagena	24	Negativa

14	M3.1R	6-14	Raíz	Cartagena	24	Negativa
15	M4SER	6-15	Suelo extra rizosférico	Cartagena	24	Negativa
16	M4SR	6-16	Suelo rizosférico	Cartagena	24	Negativa
17	M4R	6-17	Raíz	Cartagena	24	Positiva
18	M4.1R	6-18	Raíz	Cartagena	24	Negativa
19	M5SER	6-19	Suelo extra rizosférico	Cartagena	25	Negativa
20	M5SR	6-20	Suelo rizosférico	Cartagena	25	Negativa
21	M5R	6-21	Raíz	Cartagena	25	Positiva
22	M5.1R	6-22	Raíz	Cartagena	25	Negativa
23	M6SER	6-23	Suelo extra rizosférico	Cartagena	25	Negativa
24	M6SR	6-24	Suelo rizosférico	Cartagena	25	Negativa
25	M6R	6-25	Raíz	Cartagena	25	Positiva
26	M6.1R	6-26	Raíz	Cartagena	25	Positiva

Cuadro 41. Extracción de ADN en muestras frescas de Suelo extra rizosférico, Suelo rizosférico y Raíz de finca San Pablo y 28 Millas.

Id	Id Usuario	Id BM	Tipo de muestra	Finca	Cable	Detección
1	M1SER	5-359	Suelo extrarizosférico	San Pablo	4	Negativa
2	M1SR	5-360	Suelo rizosférico	San Pablo	4	Negativa
3	M1R	5-361	Raíz	San Pablo	4	Negativa
4	M2SER	5-362	Suelo extrarizosférico	San Pablo	5	Negativa
5	M2SR	5-363	Suelo rizosférico	San Pablo	5	Negativa
6	M2R	5-364	Raíz	San Pablo	5	Negativa
7	M3SER	5-365	Suelo extrarizosférico	San Pablo	7	Negativa
8	M3SR	5-366	Suelo rizosférico	San Pablo	7	Negativa
9	M3R	5-367	Raíz	San Pablo	7	Negativa
10	M4SER	5-368	Suelo extrarizosférico	San Pablo	11	Negativa
11	M4SR	5-369	Suelo rizosférico	San Pablo	11	Negativa

12	M4R	5-370	Raíz	San Pablo	11	Negativa
13	M5SER	5-371	Suelo extrarizosférico	San Pablo	29	Negativa
14	M5SR	5-372	Suelo rizosférico	San Pablo	29	Negativa
15	M5R	5-373	Raíz	San Pablo	29	Negativa
16	M6SER	5-374	Suelo extrarizosférico	San Pablo	22	Negativa
17	M6SR	5-375	Suelo rizosférico	San Pablo	22	Negativa
18	M6R	5-376	Raíz	San Pablo	22	Negativa
19	M7Bosque	5-377	Bosque	28 Millas	-	Negativa
20	M8Bosque	5-378	Bosque	28 Millas	-	Negativa
21	M9SER	5-379	Suelo extrarizosférico	28 Millas	-	Negativa
22	M9SR	5-380	Suelo rizosférico	28 Millas	-	Negativa
23	M9R	5-381	Raíz	28 Millas	-	Negativa

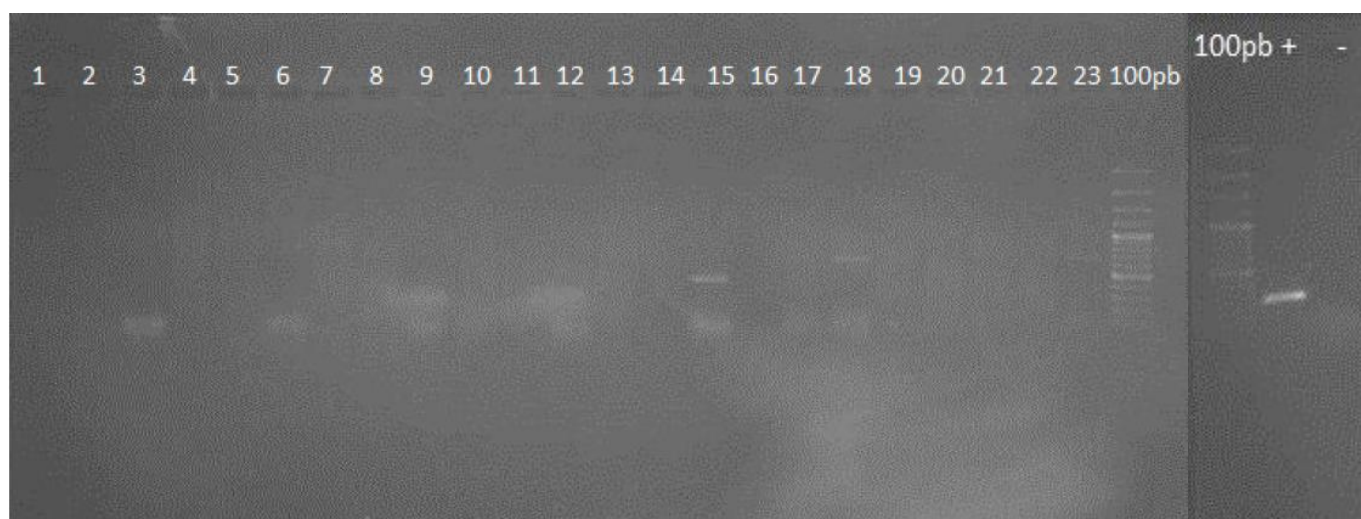


Figura 22. Gel Agarosa 1% para la amplificación del iniciador SpollABF/R específico para *Pasteuria penetrans* .



Figura 23. Gel Agarosa 1% para la amplificación de tres pares de iniciadores específicos para *Pasteuria penetrans* (atpF/R y SigEF/R).

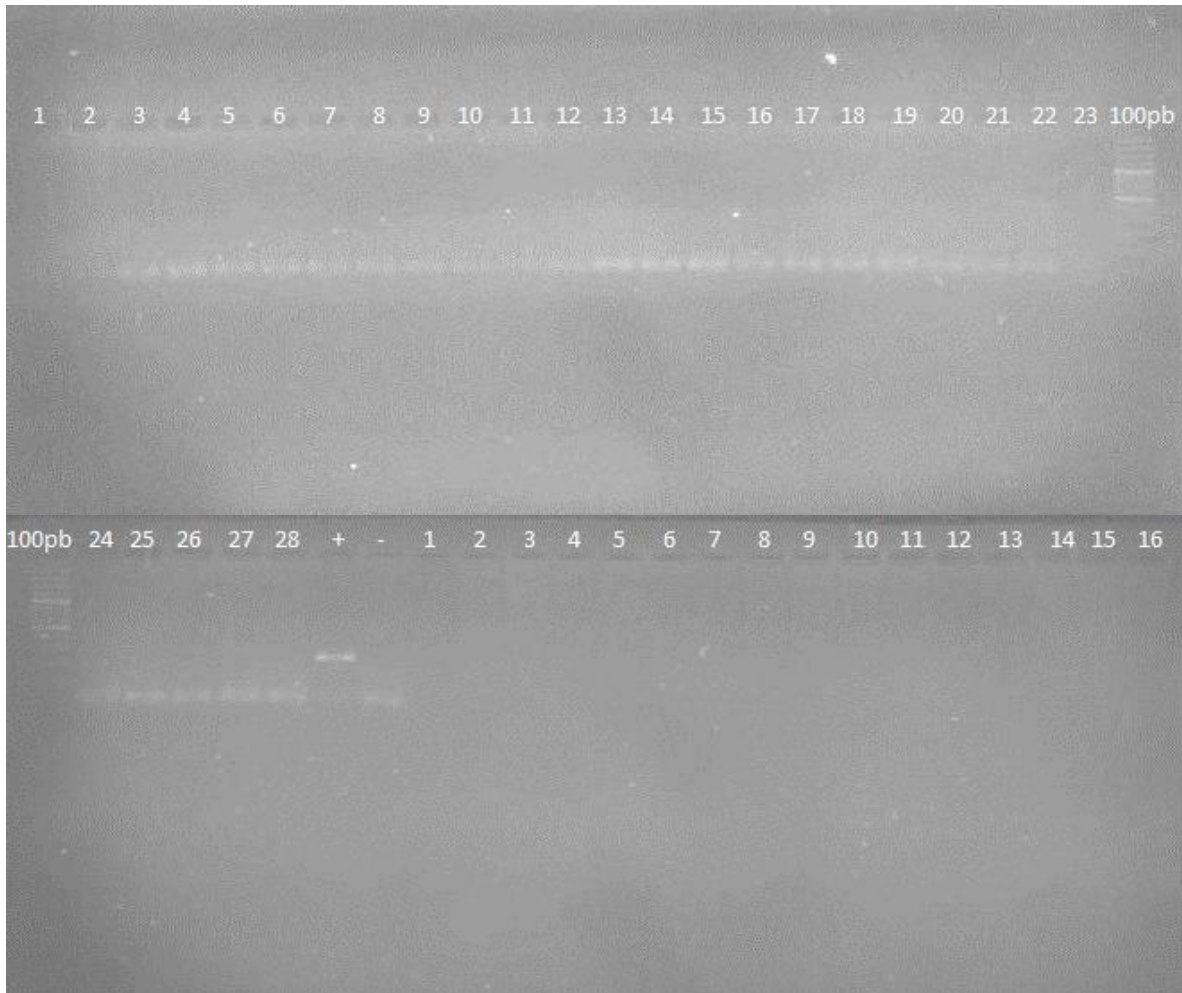
Cuadro 42. Extracción de ADN en muestras frescas de Raíz de plantas de tomate. La Rita

Id	Id Usuario	Id BM	Tipo de muestra	Finca	Detección
1	1	7-64	Raíz tomate JR	La Rita	Positiva
2	2	7-65	Raíz tomate JR	La Rita	Positiva
3	3	7-66	Raíz tomate JR	La Rita	Negativa
4	4	7-67	Raíz tomate JR	La RiTa	Positiva
5	5	7-68	Raíz tomate JR	La RiTa	Negativa
6	TS-1M2C24C	7-69	Cultivo	Cartagena	Negativa

Cuadro 43. Extracción de ADN en muestras frescas de Suelo extra rizosférico, Suelo rizosférico y Raíz de finca Rebusca.

Id	Id	Id BM	Tipo de muestra	Finca	Cable	Detección
----	----	-------	-----------------	-------	-------	-----------

	Usuario					
1	SER-M5	3-5	Suelo extrarizosférico	Cartagena	25	Negativa
2	SR-M5	3-6	Suelo rizosférico	Cartagena	25	Negativa
3	R-M5	3-7	Raíz	Cartagena	25	Negativa
4	1H	3-19	Nematodo	Duacari 2		Negativa
5	1P	3-20	Nematodo	Duacari 2		Negativa
6	5H	3-21	Nematodo	Duacari 2		Negativa
7	5P	3-22	Nematodo	Duacari 2		Negativa
8	4P	3-23	Nematodo	Duacari 2		Negativa
9	4H	3-24	Nematodo	Duacari 2		Negativa
10	3H	3-25	Nematodo	Duacari 2		Negativa
11	3R	3-26	Nematodo	Duacari 2		Negativa
12	2H	3-27	Nematodo	Duacari 2		Negativa
13	SER-M1	3-53	Suelo extrarizosférico	Rebusca	23-TD	Negativa
14	SR-M1	3-54	Suelo rizosférico	Rebusca	23-TD	Negativa
15	R-M1	3-55	Raíz	Rebusca	23-TD	Negativa
16	SER-M2	3-56	Suelo extrarizosférico	Rebusca	23-TI	Negativa
17	SR-M2	3-57	Suelo rizosférico	Rebusca	23-TI	Negativa
18	R-M2	3-58	Raíz	Rebusca	23-TI	Negativa
19	SER-M3	3-59	Suelo extrarizosférico	Rebusca	23-TI	Negativa
20	SR-M3	3-60	Suelo rizosférico	Rebusca	23-TI	Negativa
21	R-M3	3-61	Raíz	Rebusca	23-TI	Negativa
22	SER-M4	3-62	Suelo extrarizosférico	Rebusca	24	Negativa
23	SR-M4	3-63	Suelo rizosférico	Rebusca	24	Negativa
24	R-M4	3-64	Raíz	Rebusca	24	Negativa
25	SER-M5	3-65	Suelo extrarizosférico	Rebusca	25	Negativa
26	SR-M5	3-66	Suelo rizosférico	Rebusca	25	Negativa
27	R-M5	3-67	Raíz	Rebusca	25	Negativa
28	BS-M6	3-68	Suelo de Bosque	Rebusca	-	Negativa



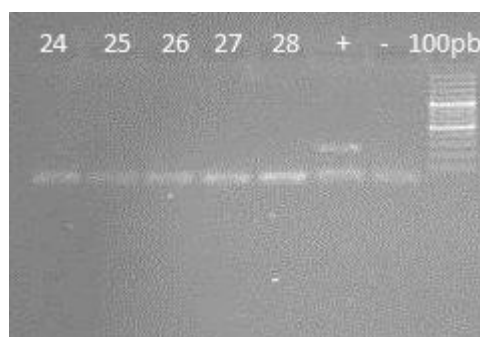
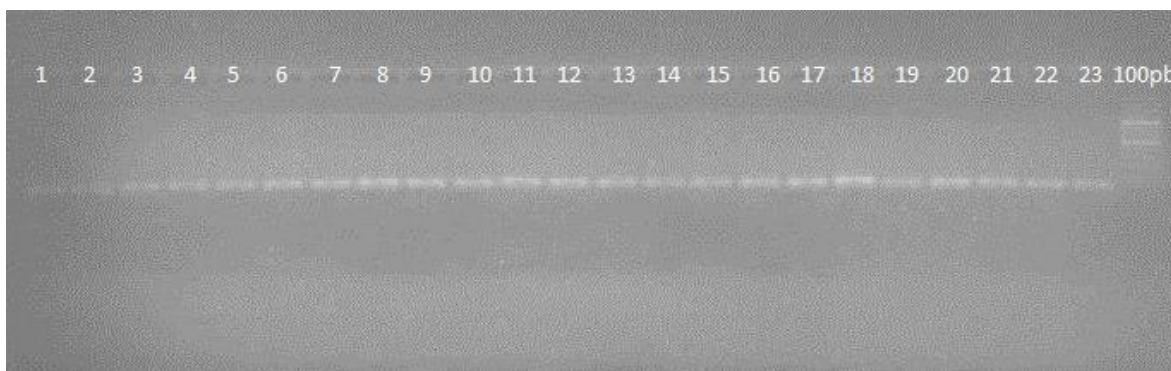


Figura 24. Gel Agarosa 1.5% para la amplificación de tres pares de iniciadores específicos para *Pasteuria penetrans* (SigEF/R, SpollABF/R, atpF/R).

Cuadro 44. Extracción de ADN en muestras frescas de Suelo extra rizosférico, Suelo rizosférico y Raíz de finca Platanera Sixaola.

Id	Id Usuario	Id BM	Tipo de muestra	Finca	Cable	Detección
1	M1SER	5-41	Suelo extrarizosferico	Platanera	37	Negativa
2	M1SR	5-42	Suelo rizosferico	Platanera	37	Negativa
3	M1R	5-43	Raíz	Platanera	37	Negativa
4	M2SER	5-44	Suelo extrarizosferico	Platanera	45	Negativa
5	M2SR	5-45	Suelo rizosferico	Platanera	45	Negativa
6	M2R	5-46	Raíz	Platanera	45	Negativa
7	M3SER	5-47	Suelo extrarizosferico	Platanera	48	Negativa
8	M3SR	5-48	Suelo rizosferico	Platanera	48	Negativa

9	M3R	5-49	Raíz	Platanera	48	Negativa
10	M4SER	5-50	Suelo extrarizosferico	Platanera	8	Negativa
11	M4SR	5-51	Suelo rizosferico	Platanera	8	Negativa
12	M4R	5-52	Raíz	Platanera	8	Negativa
13	M5SER	5-53	Suelo extrarizosferico	Platanera	25	Negativa
14	M5SR	5-54	Suelo rizosferico	Platanera	25	Negativa
15	M5R	5-55	Raíz	Platanera	25	Negativa
16	M6	5-56	Suelo	Bosque P	-	Negativa
17	M7SER	5-57	Suelo extrarizosferico	Lucía	-	Negativa
18	M7SR	5-58	Suelo rizosferico	Lucía	-	Negativa
19	M7R	5-59	Raíz	Lucía	-	Negativa
20	M8SER	5-60	Suelo extrarizosferico	Dulcemina	-	Negativa
21	M8SR	5-61	Suelo rizosferico	Dulcemina	-	Negativa
22	M8R	5-62	Raíz	Dulcemina	-	Negativa
23	M9SER	5-63	Suelo extrarizosferico	Maricela	-	Negativa
24	M9SR	5-64	Suelo rizosferico	Maricela	-	Negativa
25	M9R	5-65	Raíz	Maricela	-	Negativa
26	Plato A	5-66	Cultivo	Duacari2	-	Negativa
27	Plato B	5-67	Cultivo	Duacari2	-	Negativa
28	Plato C	5-68	Cultivo	Duacari2	-	Negativa



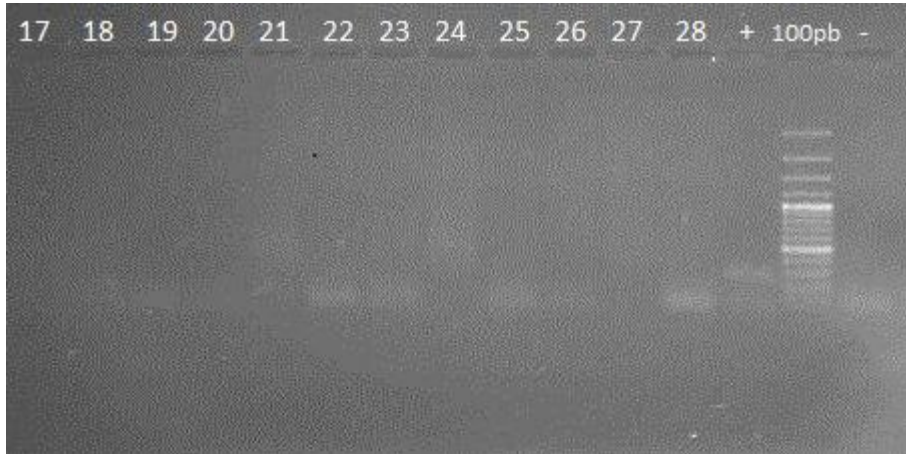
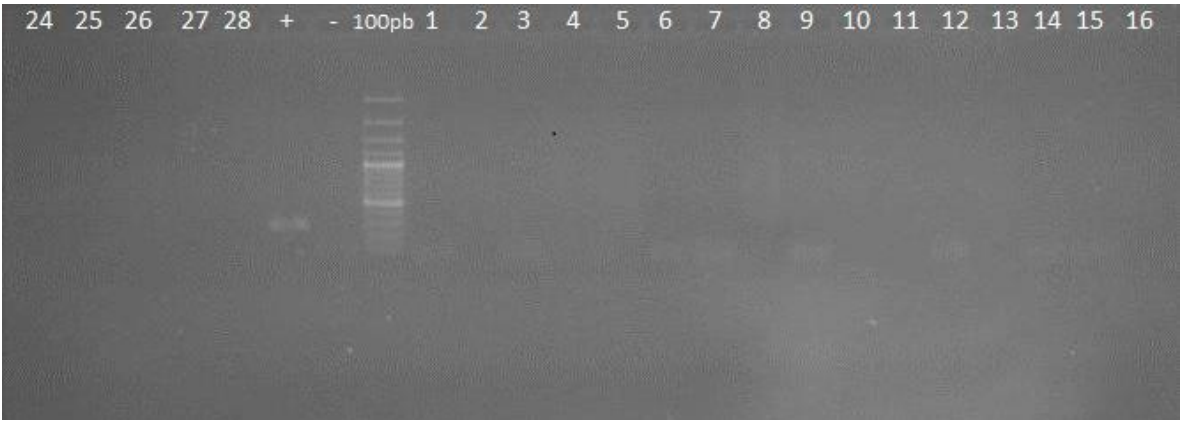




Figura 25. Gel Agarosa 1.5% para la amplificación de tres pares de iniciadores específicos para *Pasteuria penetrans* (SigEF/R, SpoliABF/R, atpF/R).

Cuadro 45. Extracción de ADN en muestras frescas de Suelo extra rizosférico, Suelo rizosférico y Raíz de finca Duacari 2.

Id	Id Usuario	Tipo de muestra	Finca	Detección
1	M1 R	Raíz	Duacari II	Negativa
2	M1 SR	Suelo rizosferico	Duacari II	Negativa
3	M1 SER	Suelo extra rizosferico	Duacari II	Negativa
4	M2 R	Raíz	Duacari II	Negativa
5	M2 SR	Suelo rizosferico	Duacari II	Negativa
6	M2 SER	Suelo extra rizosferico	Duacari II	Negativa
7	M3 R	Raíz	Duacari II	Negativa
8	M3 SR	Suelo rizosferico	Duacari II	Negativa
9	M3 SER	Suelo extra rizosferico	Duacari II	Negativa
10	M4 R	Raíz	Duacari II	Negativa
11	M4 SR	Suelo rizosferico	Duacari II	Negativa

12	M4 SER	Suelo extra rizoferico	Duacari II	Negativa
13	M5 R	Raíz	Duacari II	Negativa
14	M5 SR	Suelo rizoferico	Duacari II	Negativa
15	M5 SER	Suelo extra rizoferico	Duacari II	Negativa

Cuadro 46. Extracción de ADN en muestras frescas de *Meloidogyne* sp, extraídos de plantas de tomate en invernadero.

Id	Id Usuario	Id BM	Tipo de muestra	Finca	Detección
1	HS-M1	9-79	Nematodo	La Rita	Negativa
2	HS-M2	9-80	Nematodo	La Rita	Negativa
3	HS-M3	9-81	Nematodo	La Rita	Negativa
4	HS-M4	9-82	Nematodo	La Rita	Negativa
5	HS-M5	9-83	Nematodo	La Rita	Positiva
6	HS-M6	9-84	Nematodo	La Rita	Positiva
7	HS-M7	9-85	Nematodo	La Rita	Negativa
8	HS-M8	9-86	Nematodo	La Rita	Positiva
9	HS-M9	9-87	Nematodo	La Rita	Negativa
10	HS-M10	9-88	Nematodo	La Rita	Negativa
11	HS-M11	9-89	Nematodo	La Rita	Negativa
12	HS-M12	9-90	Nematodo	La Rita	Negativa
13	HS-M13	9-91	Nematodo	La Rita	Negativa
14	HS-M14	9-92	Nematodo	La Rita	Negativa
15	HS-M15	9-93	Nematodo	La Rita	Negativa
16	HS-M16	9-94	Nematodo	La Rita	Negativa
17	HS-M17	9-95	Nematodo	La Rita	Negativa
18	HS-M18	9-96	Nematodo	La Rita	Negativa