

ARTÍCULO ORIGINAL

Detección de *Pasteuria penetrans* (Thorne) Sayre y Starr en la región occidental de Cuba¹

Lucila Gómez^I, R. Enrique^I, Mayra G. Rodríguez^I, Odalis Ramos^{II}, Hortensia Gandarilla^{II}

^ILaboratorio de Nematología Agrícola. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque. Cuba. Correo electrónico: lucila@censa.edu.cu; ^{II}Laboratorio Central de Cuarentena (LCC). Centro Nacional de Sanidad Vegetal (CNSV). La Habana. Cuba

RESUMEN: La prospección de *Pasteuria penetrans* (Thorne) Sayre y Starr, se realizó en diversos sistemas agrícolas de cinco provincias de la región occidental de Cuba. Se colectaron 240 muestras compuestas de suelo y raíces de diferentes cultivos y plantas ornamentales infestados por *Meloidogyne* spp. Se determinó el parasitismo natural de la bacteria en hembras de *Meloidogyne* spp. y el promedio de endosporas por juvenil infestivo en el suelo. La bacteria se detectó en tres localidades de Artemisa, tres de Mayabeque y cinco de La Habana, lo que representó el 17% del total de muestras analizadas. El parasitismo se evidenció en las especies *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood y *Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood, con una mayor frecuencia de aparición en la primera. El número promedio de endosporas adheridas a los juveniles osciló en un rango de 2 a 3.

Palabras clave: *Meloidogyne*, control biológico, endosporas, nematodos agalleros, *Pasteuria penetrans*.

Detection of *Pasteuria penetrans* (Thorne) Sayre & Starr in the western region of Cuba

ABSTRACT: A survey of *Pasteuria penetrans* (Thorne) Sayre & Starr was carried out in several production systems of five provinces of the western region of Cuba. A total of 240 samples composed of soil and roots of different crops and ornamental plants infested by *Meloidogyne* spp. were collected. The percentages of natural parasitism of females and the number of endospore attached per juvenile were determined. The bacterium was detected in three of the five provinces. It occurred in three localities of Artemisa, three of Mayabeque, and five in La Habana, representing 17% of the total samples analyzed. A high percentage of parasitism was evidenced in *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood and *Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood. The highest frequency of occurrence of *P. penetrans* was in *M. incognita*. The number of endospores adhered to the nematode cuticle ranged from 2 to 3.

Key words: *Meloidogyne*, biological control, endospores, root-knot nematodes, *Pasteuria penetrans*.

INTRODUCCIÓN

Entre los nematodos que afectan a las plantas, los del género *Meloidogyne* Göldi, son considerados una de las plagas más peligrosas. Estos organismos poseen una amplia gama de hospedantes y producen pérdidas considerables en la agricultura a nivel mundial (1).

En Cuba, las especies más frecuentes en los sistemas de producción intensiva de hortalizas son *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood y *Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood. Estas especies pueden aparecer habitando de manera conjunta en el suelo o una misma raíz. Igualmente pueden convivir con otras tan peligrosas como *Meloidogyne enterolobii*

¹ Investigación realizada en el marco de proyecto: *Pasteuria penetrans*, una bacteria para incrementar la fortaleza del control biológico de nematodos formadores de agallas. Programa Ramal de Control Biológico, Cuba.

Yang y Eisenback (sin. *Meloidogyne mayaguensis* Rammah y Hirschmann) (2), lo que dificulta su diagnóstico y complejiza el manejo.

En los sistemas hortícolas los daños ocasionados por esta plaga son severos debido al uso continuado de variedades susceptibles y escasas medidas de manejo. De acuerdo a los resultados informados por Rodríguez *et al.* (3), estos nematodos producen acortamiento del ciclo de los cultivos y pérdidas considerables en los rendimientos. Para su control, se utilizan productos químicos sintéticos. Sin embargo, es un hecho reconocido el riesgo que para la salud y el ambiente representan estas sustancias (4).

Uno de los retos apremiantes de la agricultura en la actualidad es la búsqueda de alternativas no químicas, que logren reducir los niveles poblacionales de la plaga por debajo del umbral económico. Para ello se estudian métodos de manejo natural que incluyen el uso de agentes de control biológico. Estos organismos han cobrado gran importancia por su inocuidad al hombre y al ambiente, y también por sus potencialidades para ser introducidos en sistemas sostenibles (5).

La bacteria formadora de endosporas *Pasteuria penetrans* (Thorne) Sayre y Starr, es un parásito obligado de *Meloidogyne* spp. y es considerada uno de los agentes de control biológico más exitosos en la regulación de las poblaciones de estos nematodos. La importancia de la bacteria se debe a su agresividad y rusticidad (6). Entre sus principales ventajas se encuentran la supervivencia prolongada de las endosporas en el suelo, resistencia al calor y desecación, inocuidad al hombre y los animales y la posibilidad de combinarse con prácticas culturales (7). Su condición de parásito obligado ha limitado el desarrollo de un producto comercial; sin embargo, la posibilidad de reproducirse masivamente *in vivo* con su nematodo hospedante (8), propició el desarrollo de investigaciones a diferentes niveles. Los resultados en casas de vegetación y en campo a pequeña escala (9), permitieron reconocer sus potencialidades como agente de control biológico.

La efectividad demostrada por esta bacteria sobre las poblaciones de nematodos formadores de agallas, estimuló la búsqueda de aislados nativos en los sistemas hortícolas de Cuba, pues tener nuevos agente de control biológico con posibilidades de uso en los programas de manejo, contribuirá a diversificar la acción de los agentes de control biológico existentes y ampliar la disponibilidad de estos organismos en la agricultura cubana.

Los objetivos de este trabajo fueron detectar, aislar y caracterizar poblaciones de *P. penetrans* en suelos hortícolas infestados por *Meloidogyne* spp. de la región occidental de Cuba.

MATERIALES Y MÉTODOS

La prospección de *P. penetrans*, se realizó durante los años 2010-2011, en sistemas abiertos y de producción protegidas de hortalizas, así como áreas de plantas ornamentales y aromáticas en las provincias Pinar del Río, Artemisa, Ciudad de la Habana, Mayabeque y Matanzas. Se colectaron 240 muestras compuestas de suelo y raíces en un total de 57 localidades. En todos los casos los cultivos presentaron síntomas de ataque de nematodos formadores de agallas *Meloidogyne* spp.

Dentro de las hortalizas, los cultivos muestreados fueron tomate (*Solanum lycopersicum* L.), pepino (*Cucumis sativus* L.), pimiento (*Capsicum annuum* L.), ají cachucha (*Capsicum* sp.), lechuga (*Lactuca sativa* L.), berenjena (*Solanum melongela* L.), col de repollo (*Brassica oleraceae* L.). También se obtuvieron muestras de plantas aromáticas como orégano (*Origanum vulgare* L.) y jengibre (*Zingiber officinale* Rosc.), así como de los cultivos perennes plátano (*Musa* sp.) y vid (*Vitis vinifera* L.). Se incluyeron además las plantas ornamentales manto (*Coleus blumei* L.) y madama (*Impatiens balsamina* L.) por la presencia de síntomas de ataque de *Meloidogyne* spp.

En los sistemas de cultivos protegidos se colectaron cinco muestras compuestas de suelo y raíces de cada casa o túnel y en los sistemas abiertos se extrajeron 15 muestras al azar a lo largo y ancho del campo (10). En todos los casos las sub-muestras se tomaron a 25-30 cm de profundidad y conjuntamente con las raíces se conformó una muestra única compuesta de 1kg de suelo y 200g de raíces por unidad productiva. Las muestras se rotularon y trasladaron a los Laboratorios de Nematología del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria y del Laboratorio Central de Cuarentena Vegetal para su procesamiento y análisis.

Las raíces se lavaron cuidadosamente por separado y de ellas se extrajeron 50 hembras de *Meloidogyne* spp., que se colocaron individualmente en una gota de bromofenol azul sobre un portaobjeto. Luego se comprimieron con un cubre objeto, con el propósito de detectar la presencia de endosporas de *P. penetrans*. Se utilizó un microscopio óptico Zeiss (100X), que facilitó la observación de la bacteria en el interior de las hembras parasitadas y su caracterización morfológica. El análisis morfométrico de las endosporas y su núcleo central se realizó a 20 esporas por cada población de *P. penetrans* encontrada, para lo cual se utilizó un micrómetro ocular de tornillo acoplado al microscopio.

La identificación de las poblaciones de *Meloidogyne* asociadas a la bacteria se realizó mediante la obser-

vación del patrón perineal de 15 hembras, teniendo en cuenta los parámetros cualitativos señalados por Jepson (11).

Cada muestra de suelo se homogenizó y tres submuestra de 10g y se colocaron en embudos Baermann modificado (12) durante tres días. Los juveniles infestivos (J_2) de *Meloidogyne* spp. se observaron en un microscopio invertido para la detección de endosporas de *P. penetrans* adheridas a su cutícula y su cuantificación.

La detección de la bacteria permitió determinar su frecuencia de aparición con relación al total de muestras analizadas. Se determinó el porcentaje de hembras parasitadas y el número promedio de endosporas por J_2 .

Las raíces y el suelo de las muestras donde se detectó *P. penetrans*, se depositaron en macetas de cinco litros de capacidad y se les sembró tomate var. Campbell-28. De esta manera se conservaron las poblaciones originales de la bacteria y su nematodo hospedante para futuros trabajos con este agente de control biológico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La presencia de *P. penetrans* se constató en tres localidades de Artemisa e igual número en Mayabeque

y en cinco de la provincia La Habana, lo que representó el 17% de muestras positivas con respecto al total de muestras analizadas.

En todos los cultivos donde se encontró la bacteria, se observaron los síntomas característicos del ataque del nematodo, y de hembras adultas completamente llenas de esporas. La bacteria se halló asociada a las especies *M. arenaria* y *M. incognita* (Tabla 1); en esta última, con mayor frecuencia de aparición (67%). En las muestras de suelo se observaron J_2 con esporas adheridas. El número promedio de endosporas por J_2 , en todos los casos estuvo entre 2 y 3.

El estudio morfológico de las poblaciones de la bacteria arrojó que estas presentaron características similares en cuanto al diámetro de las endosporas y de su cuerpo central (Tabla 2, Figura 1). El diámetro de las endosporas estuvo en el intervalo de 3-4 μm , el cual se corresponde con el descrito para los miembros del grupo *P. penetrans* que infectan nematodos formadores de agallas *Meloidogyne* spp. (13).

Los estudios de prospección de *P. penetrans* en Cuba son escasos. A inicio de los años 80, la bacteria fue informada por Fernández (14) y en estudios más recientes Gandarilla (15), la encontró en plantas ornamentales en un 5,3% de muestras analizadas.

TABLA 1. Detección de *Pasteuria penetrans*. en la región occidental de Cuba./ *Detection of Pasteuria penetrans in the western region of Cuba.*

Provincia	Municipio	Localidad	Cultivo	Especie de <i>Meloidogyne</i>	Parasitismo Hembras (%)	Población de <i>P. penetrans</i>
Artemisa	Güira de Melena	Finca Las Mercedes	<i>Capsicum</i> sp.	<i>M. incognita</i>	100	PpA ₁
		CPA Niceto Pérez	<i>V. vinifera</i>	<i>M. arenaria</i>	95	PpA ₂
	Alquizar	UBPC 35.	<i>Musa</i> sp.	<i>M. incognita</i>	70	PpA ₃
Mayabeque	Nueva Paz	ECV	<i>S. lycopersicum</i>	<i>M. incognita</i>	97	PpNP ₁
		CCP	<i>C. sativus</i>	<i>M. arenaria</i>	98	PpNP ₂
	Madruga	EAP Rubén M. Villena.	<i>C. annunn</i>	<i>M. incognita</i>	96	PpM
La Habana	Alamar	Organopónico Alamar, Rotonda	<i>S. lycopersicum</i>	<i>M. incognita</i>	98	PpCH ₁
		Zona 1, Alamar	<i>I. balsamina</i>	<i>M. incognita</i>	97	PpCH ₂
	La Lisa	Organopónico San Agustín	<i>O. vulgare</i>	<i>Meloidogyne</i> sp.	95	PpCH ₃
		Huerto Giraldilla	<i>S. lycopersicum</i>	<i>M. incognita</i>	85	PpCH ₄
	Marianao	Vivero 130	<i>C. blumei</i>	<i>M. incognita</i> y <i>M. arenaria</i>	90	PpCH ₅

Leyenda: CPA. Cooperativa de Producción Agropecuaria; UBPC. Unidad Básica de Producción Cooperativas; ECV. Empresa de Cultivos Varios; CCP. Casa de Cultivos Protegidos; EAP. Empresa Agropecuaria.

En este trabajo se corroboró la presencia de *P. penetrans* en un mayor número de cultivos y áreas que los informados con anterioridad en el país. Su asociación a las especies de *Meloidogyne* más distribuidas guarda una estrecha relación con los resultados informados por Gómez (2). Estos hallazgos brindan impor-

TABLA 2. Características morfológicas de las poblaciones de *Pasteuria penetrans* y las especies de *Meloidogyne* asociadas./ *Morphological features of Pasteuria penetrans isolates and the species of Meloidogyne associated.*

Población de <i>P. penetrans</i>	Diámetro de estructuras (µm)	
	Endospora	Cuerpo central
PpA ₁	3,9	1,6
PpA ₂	3,9	1,6
PpA ₃	3,5	1,2
PpNP ₁	3,7	1,25
PpNP ₂	3,5	1,3
PpM	3,4	1,25
PpCH ₁	3,75	1,3
PpCH ₂	3,75	1,3
PpCH ₃	3,9	1,5
PpCH ₄	3,7	1,4
PpCH ₅	3,9	1,5

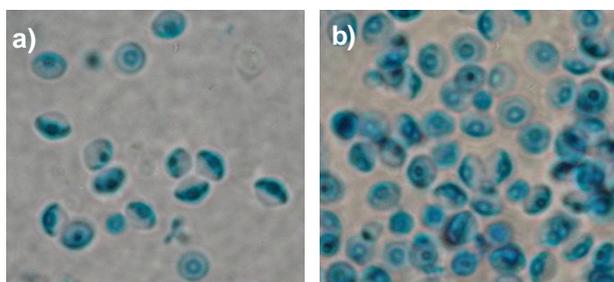


FIGURA 1. Endosporas de *Pasteuria penetrans* extraídas del pseudoceloma de hembras de *Meloidogyne* spp. a) Población PpCH₁, b) Población PpNP₁./ *Pasteuria penetrans* endospores from the pseudocoelom of *Meloidogyne* spp. females. a) PpCH₁ population, b) PpNP₁ population.

tantes elementos para la conservación y utilización de la bacteria en los programas de manejo de nematodos agalleros en Cuba.

El alto porcentaje de hembras parasitadas reafirman lo informado por Gandarilla *et al.* (16), quienes encontraron un porcentaje de parasitismo mayor de 85%, en una parcela de producción de ornamentales infestadas naturalmente con *P. penetrans*.

Los resultados revelaron que el 54% de las localidades donde se detectó la bacteria corresponden a

huertos, organopónicos y fincas los cuales se encuentran en un proceso de transformación de agricultura convencional a agricultura ecológica. En estos sistemas se tiene en cuenta la conservación de la energía, los recursos, la calidad ambiental y la salud. Sin dudas, este tipo de agricultura tendrá un impacto positivo en la conservación de los enemigos naturales presentes en el agroecosistema (17).

Los suelos de las localidades pertenecientes a Madruga y Nueva Paz, anteriormente correspondían a plantaciones de caña y plátano, respectivamente. Estos cultivos, al igual que la vid, se consideran de carácter permanente porque se mantienen durante prolongados periodos de tiempo, lo que podría favorecer el equilibrio entre los diferentes componentes del suelo como sistema y por tanto la presencia de plagas y sus antagonistas (18).

El número de endosporas cuantificadas por J₂ podría estar relacionado con factores edafoclimáticos como temperatura, humedad, porosidad, textura y fracción iónica del suelo que influyen en la disponibilidad de las endosporas para adherirse a la cutícula de los J₂ (19; 20). No obstante, este valor se considera adecuado para que ocurra la penetración de los juveniles a las raíces, ya que más de 3,5 endosporas por J₂ entorpece su movilidad y por consiguiente dificulta la penetración e infestación al vegetal (21).

Este trabajo contribuye al conocimiento de la incidencia de *P. penetrans* sobre las especies de nematodos formadores de agallas en la región occidental de Cuba. Facilitó el aislamiento y conservación de poblaciones nativas con posibilidades de desarrollo como agente de control biológico para el manejo de *Meloidogyne* spp.

REFERENCIAS

- Ornat C, Sorribas FJ. Integrated management of root-knot nematodes in Mediterranean horticultural crops. En: Ciancio A, Mukerji KG, editors. Integrated Management and Biocontrol of Vegetable and Grain Crops Nematodes. Springer; 2008; 295-319 p.
- Gómez L. Diagnóstico de nematodos agalleros y prácticas Agronómicas para el manejo de *Meloidogyne incognita* en la Producción Protegida de Hortalizas. [Tesis]. La Habana: Universidad Agraria de la Habana - Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, 2007.
- Rodríguez MG, Gómez L, Cuadra R, Díaz-Viruliche L, Fernández E, Casanova A, González, *et al.* Nematodos formadores de agallas en Sistemas de

- Cultivos Protegidos: Diagnostico y Manejo. Informe Final de Proyecto. Programa ramal de Hortalizas - MINAG. 171 pp. (Inédito - Laboratorio de Nematología CENSA). (2006).
4. Pérez N. Uso e impacto en la salud de los plaguicidas la y lb en Cuba. *Agricultura Orgánica*. 2008;2:24-27.
 5. Piedra NR. Manejo biológico de nematodos fitoparasitos con hongos y bacterias. *Tecnología en Marcha*. 2008;2(1):123-132.
 6. Stirling GR. Biological control of plant-parasitic nematodes. Progress, problems, and prospects. CAB International, Wallingford, UK;1991.
 7. Javed N, El-Hassan S, Gowen S, Pemproke B, Inamul-Haq M. The potential of combining *Pasteuria penetrans* and neem (*Azadirachta indica*) formulations as a management system for root-knot nematodes on tomato. *Eur J Plant Pathol*. 2008;120:53-60.
 8. Stirling GR, Wachtel MF. Mass production of *Bacillus penetrans* for the biological control of root-knot nematodes. *Nematologica*. 1980;26:308-312.
 9. Ramos FA, Freitas LG, Martinelli PRP, Alves RMS, Ferraz S, Demuner AJ, Borges EE, Júnior WCJ. Efeitos de diferentes níveis de matéria orgânica no solo e de inóculo sobre a interação planta-*Meloidogyne* spp. e a produção massal de *Pasteuria penetrans*. *Summa Phytopathol Botucatu*. 2007;33(4):397-401.
 10. Bezooijen J. Methods and Techniques for Nematology. Revised version. Wageningen, Netherland; 2006.p.108.
 11. Jepson S. Identification of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). CAB. International. Cambrian New LTD. Aberystwyth, UK;1987:265.p.
 12. Pitcher RS, Flegg JJM. An improved final separation sieve for the extraction of plant-parasitic nematodes from soil debris. *Nematologica*. 1968;14:123-127.
 13. Chen ZX, Dickson DW. Biological control of nematodes with bacterial antagonists. En: Chen ZX, Chen SY, Dickson DW, editors. *Nematology-Advances and perspective*. Vol II. Nematode management and utilization. CAB International, UK; 2004.p.1052-1067.
 14. Fernández E. Reporte sobre un endoparásito de nematodos fitoparásitos en Cuba. *Protección de Plantas. Cien. Tec. Agric.* 1982;5(1):79-87.
 15. Gandarilla H. Fitonematodos de las plantas ornamentales. Nocividad y antagonistas. [Tesis]. Ciudad de La Habana. Instituto Nacional de Investigaciones de Sanidad Vegetal, 2004.
 16. Gandarilla H, González ML, Piedad G, Fernández E. Efecto supresivo de *P. penetrans* en condiciones de campo. MIP'2000 Forum Tecnológico Especializado Manejo Integrado de Plagas. Ciudad de La Habana. Cuba; 2000.
 17. Pérez N. La Agricultura orgánica. En: García A, editor. Manejo ecológico de plagas. Centro de Estudios de Desarrollo Agrario y Rural-CEDAR-UNAH, Cuba; 2004. p.17-38.
 18. Bautista CJ, García R, Pérez J, Zavaleta E, Montes R, Ferrera R. Inducción de supresividad a fitopatógenos del suelo. Un enfoque holístico al control biológico. *Interciencia*. 2008;33(2):96-102.
 19. Dabiré KR, Mateille T. Soil texture and irrigation influence the transport and the development of *Pasteuria penetrans*, a bacterial parasite of root-knot nematodes. *Soil Biol Biochem*. 2004;36:343-351.
 20. Dabiré RK, Ndiaye S, Mounport D, Mateille T. Relationships between abiotic soil factors and epidemiology of the biocontrol bacterium *Pasteuria penetrans* in a root-knot nematode *Meloidogyne javanica*-infested field. *Biological Control*. 2007;40:22-29.
 21. Kariuki G M, Brito JA, Dickson DW. Effects of *pasteuria penetrans* endospore rate of attachment on root penetration and fecundity of *Meloidogyne arenaria* race 1. *Nematropica*. 2006;36(2):261-267.

Recibido: 9-4-2012.

Aceptado: 20-6-2012.