

Artículo Reseña

***Pasteuria penetrans* COMO AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO
DE *Meloidogyne* spp.**

Lucila Gómez*, Hortensia Gandarilla**, Mayra G. Rodríguez*

*Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Apartado 10. San José de las Lajas,
La Habana, Cuba. Correo electrónico: lucila@censa.edu.cu;

**Laboratorio Central de Cuarentena Vegetal (LCCV). Ayuntamiento No 231 e/ Lombillo y San Pedro,
Plaza de la Revolución, Ciudad de La Habana, Cuba

RESUMEN: El objetivo de esta reseña es hacer una recopilación de la información más reciente de la biología, ecología y potencialidades de *Pasteuria penetrans* y otras especies del género como agente de control biológico. *P. penetrans* es una bacteria formadora de endosporas y micelio, parásito obligado de nematodos del género *Meloidogyne*. En los últimos años muchos han sido los progresos para entender su biología e importancia como agente de control biológico de nematodos formadores de agallas en el suelo. Las especies del género *Pasteuria*, están ampliamente distribuida a nivel mundial y han sido informadas, en al menos, 80 países infectando 323 especies de nematodos pertenecientes a 116 géneros que incluyen nematodos de vida libre, fitoparásitos y nematodos entomopatógenos. La temperatura y las condiciones físico-químicas, así como los factores bióticos del suelo desempeñan una importante función en su biología y patogenicidad. El cultivo *in vitro* de la bacteria no ha sido exitoso hasta el presente, por lo que las producciones de endosporas a gran escala se realizan en sistemas *in vivo*. Las potencialidades de *P. penetrans* en el manejo de poblaciones de *Meloidogyne* spp., así como su función en los suelos supresores son examinados en esta reseña.

(Palabras clave: *Pasteuria penetrans*; *Meloidogyne* spp.; control biológico; ecología; mecanismos de adhesión)

***Pasteuria penetrans* AS A BIOLOGICAL CONTROL AGENT OF *Meloidogyne* spp.**

ABSTRACT: The objective of this paper is to summarize the current knowledge of the biology, ecology and potentialities of *P. penetrans* and others *Pasteuria* members as biological control agents. *Pasteuria penetrans* is a mycelial, endospore-forming, bacterial parasite that has shown great potential as a biological control agent of root-knot nematodes. Considerable progress has been made during the last years in understanding its biology and importance as an agent capable of effectively suppressing root-knot nematodes in field soil. *Pasteuria* spp. are distributed worldwide and have been reported from 80 countries, parasitizing 323 nematode species belonging to 116 genera of free-living, predatory, plant-parasitic, and entomopathogenic nematodes. Temperature and physico-chemical conditions, as well as biological factors in the soil play an important role in their biology and pathogenesis. Artificial cultivation of *P. penetrans* has met with limited success; large-scale production of endospores depends on *in vivo* cultivation. The potentialities of *P. penetrans* in management of *Meloidogyne* spp. populations are also examined in this review.

(Key words: *Pasteuria penetrans*; *Meloidogyne* spp.; biological control; ecology; adhesion mechanisms)

INTRODUCCIÓN

Las especies del género *Pasteuria* Metchnikoff, se han estudiado por ser parásitos obligados de fitonematodos y poseer potencialidades como agentes del control biológico, no solo por su agresividad sino también por su rusticidad. Observaciones de campo (1,2,3) y experimentos en invernaderos y microparcels (4,5) demuestran que estos organismos pueden proporcionar un control efectivo de nematodos parásitos de plantas, solos y combinados con otras tácticas de manejo. *Pasteuria* spp., ha sido informada en una variedad de especies de nematodos hospedantes (>300) y en diversos ambientes con diferentes condiciones climáticas a nivel mundial (6,7). Su alta especificidad de hospedante y su naturaleza de parásitos obligados (8), han imposibilitado que sean cultivadas *in vitro* (9). No obstante, las ventajas que ofrece y sus atributos como agentes biocontroles, han constituido las bases para el desarrollo de investigaciones que conlleven a su inclusión en los programas de manejo integrado de fitonematodos. El objetivo de esta reseña es hacer una recopilación de la información más reciente de la biología, ecología y potencialidades de *Pasteuria penetrans* como agente de control biológico.

PARTE ESPECIAL

Reseña histórica del género *Pasteuria*

Los miembros del grupo *Pasteuria* son bacterias formadoras de micelio y endosporas, parásitas obligadas de nematodos y pulgas acuáticas. Las especies del género están ampliamente distribuidas a nivel mundial. Se han informado infectando un amplio número de especies de nematodos incluyendo fitoparásitos y de vida libre. La mayoría de los fitoparásitos de importancia económica se han observado parasitados por estas bacterias (10).

La ubicación taxonómica del grupo ha sufrido algunos cambios desde su primer informe realizado por Cobb (11), quien la observó parasitando el nematodo *Dorylaimus bulbiferus* Cobb y la describió como un protozoo. Micoletzky (12), sugirió su emplazamiento en *Duboscqia* Perez, en 1925. No fue hasta mediados de los 70 cuando un parásito de *Pratylenchus pratensis* (de Man) Filipjev, nombrado *Duboscqia penetrans*, con características similares al descrito por Micoletzky, fue examinado al microscopio electrónico y reconocido como una bacteria, no como un protozoo, y fue nombrado *Bacillus penetrans* (Thorne) Mankau (13). Sin embargo, *B. penetrans* no fue reconocido en la lista aprobada de bacterias. Posteriormente, fue renombrada

da *Pasteuria penetrans* (ex Thorne) Sayre y Starr, debido a su parecido con el actinomicete *Pasteuria ramosa* Metchnikoff, parásito de *Daphnia magna* Straus (14).

En la actualidad la taxonomía dentro del género *Pasteuria* está basada fundamentalmente en características morfológicas y patológicas, incluyendo el tamaño y forma de los esporangios y las endosporas, sus estructuras moleculares, ciclo de vida y rango de hospedante. A través del análisis comparativo de la porción de genes 16S rDNA para clarificar su taxonomía y filogenia se ha podido mostrar que los genes de *Pasteuria* son un miembro engranado en una rama de las Eubacterias Gram-positivas de *Clostridium-Bacillus-Streptococcus* y que *Pasteuria* está más relacionada con los miembros de la familia Alicyclobacillaceae que con los Actinomycetales (15).

Charles *et al.* (15) secuenciaron el genoma de *P. penetrans*, realizando un análisis a nivel de aminoácidos, usando la concatenación de 40 genes conservados e identificaron *P. penetrans* como un ancestro de *Bacillus* spp. Davies (16) observó una colinealidad genómica significativa entre *P. penetrans* y *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn en una larga secuencia contigua de genes. El resultado sugirió que la bacteria pudiera haber evolucionado a partir de una bacteria simbiótica ancestral asociada a los nematodos, posiblemente cuando los nematodos formadores de agallas evolucionaron a la alta especialización como parásitos de plantas (15).

Existen seis especies nominales dentro del género. Entre ellas, *Pasteuria ramosa* (Metchnikoff) Starr *et al.* (especie tipo) que parasita las pulgas acuáticas (Cladocera: Daphnidae). Las otras cinco son parásitos de nematodos. Estas son: *Pasteuria penetrans*, relacionada con nematodos formadores de agallas (*Meloidogyne* spp.), *Pasteuria thornei* Starr y Sayre, que parasita especies de nematodos lesionadores (*Pratylenchus* spp.) (17), *Pasteuria nishizawae* (Sayre *et al.*) Noel *et al.*, encontrada parasitando nematodos de quistes de los géneros *Heterodera* Schmidt y *Globodera* Skarbilovich (18), *Pasteuria usgae* sp. nov., que parasita el nematodo de daga *Belonolaimus longicaudatus* Rau (19) y recientemente Bishop *et al.* (20), describió una nueva especie que parasita *Meloidogyne ardenensis* Santos nombrada *Pasteuria hartismeri* Bishop *et al.*

De todas las especies de *Pasteuria* la más estudiada hasta el momento por sus potencialidades como agente de control biológico ha sido *P. penetrans*. Sin embargo, su incapacidad para ser reproducida masivamente *in vitro* ha frenado su desarrollo como produc-

to comercial (21). No obstante, para su introducción al ambiente del suelo en los estudios de campo y microparcels, se emplea el polvo de raíces secas infestadas con la bacteria, basado en el método propuesto por Stirling y Wachtel (22).

Su uso también ha estado limitado por la especificidad de los aislamientos a especies y poblaciones del género *Meloidogyne* Göldi. Algunos aislamientos de *P. penetrans* se adhieren a una determinada especie de nematodos formadores de agallas, mientras que otras son compatibles con otras especies o poblaciones de una misma especie dentro de este mismo género de nematodos (23). Es por eso que numerosos estudios han estado encaminados a dilucidar la naturaleza de la especificidad de hospedante de los aislamientos de *P. penetrans*, con vistas a mejorar las habilidades de la bacteria para su uso como agente biocontrol.

BIOLOGÍA

Ciclo de vida de *Pasteuria penetrans*

Según Davies *et al.* (24), el primer paso del proceso de infección ocurre cuando las endosporas se adhieren a la cutícula del nematodo. Las endosporas son estructuras unicelulares, no móviles, que se depositan en el suelo y son capaces de adherirse a la cutícula de un nematodo hospedante que entre en sus dominios. Una o cientos de endosporas pueden adherirse a la cutícula de la larva del segundo estado, sin embargo una sola es suficiente para infectar a su hospedante (10).

Stirling (25), informó que se requiere más de cinco esporas por nematodos para asegurar un 90 % de infección. Rao *et al.* (26) observaron que de una y dos esporas por larva de *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood se alcanzaba el 20 y el 28 % de hembras infectadas respectivamente; un 40 % con juveniles que presentaban tres a cinco esporas y el 64% a partir de 8–12 esporas por juveniles infestivos. Kariuki *et al.* (27), demostraron que a medida que aumenta el grado de adhesión el porcentaje de juveniles que penetran la raíz disminuye, debido fundamentalmente a que los juveniles con muchas esporas adheridas a su cuerpo se debilitan y retardan el encuentro con sus plantas hospedantes.

El desarrollo de la bacteria ocurre, la mayoría de las veces, en sincronía con el desarrollo de los nematodos agalleros dentro del sistema radical. Las esporas germinan una vez que el nematodo penetra a la raíz de una planta hospedante y comienza a alimentarse. El proceso de infección involucra la formación

de un tubo germinativo que atraviesa la pared del cuerpo del nematodo. En el pseudoceloma, comienza la formación de colonias primarias que tienen forma de coliflor o ramilletes de uvas alargadas. Las colonias hijas son formadas a partir de la elongación de las colonias madres y producen a su vez agrupaciones de esporangios. Las hifas terminales del micelio se alargan para formar los esporangios y estos dan origen a las endosporas que llenan todo el cuerpo de las hembras de *Meloidogyne* spp. Finalmente, el sistema reproductivo de las hembras se degenera y las endosporas maduras son liberadas al suelo (28).

El ciclo de vida se completa en un tiempo relativamente corto (18-20 días) y depende de la temperatura (29). Más de dos millones de endosporas son producidas dentro de una hembra de *Meloidogyne* parasitada (4). Algunas veces los machos también han sido encontrados completamente llenos de endosporas, los cuales después de su muerte, al igual que las hembras, se descomponen y propician la liberación de la bacteria al suelo. Hartz y Dickson (30) observaron machos de *M. arenaria* (Neal) Chitwood raza 1 llenos de endosporas maduras de *P. penetrans*, en raíces de tomate infestadas, previamente incubadas a temperaturas mayores de 35°C. Estos investigadores sugirieron que esto puede haber sido el resultado de una inversión del sexo porque el 80% de los machos parasitados tenían dos gónadas y el 20 % restante tenían una sola y no estaban parasitados por la bacteria.

Especificidad de hospedante y mecanismos de adhesión

Los nematodos hospedantes de *Pasteuria* incluyen aproximadamente 323 especies, pertenecientes a 116 géneros, distribuidos en 80 países de los cinco continentes, incluidas varias islas de los océanos Atlántico, Pacífico e Índico (8). Estas especies de nematodos poseen hábitos de alimentación distintos y ciclo de vida que varían en su duración. La presión de selección favorece a la bacteria cuya fisiología se asemeja a la de su nematodo hospedante. Según Stirling (23), poblaciones individuales de esta bacteria exhiben una gama restringida de hospedantes. Esta íntima relación sugiere que el género *Pausteria* puede contener innumerables especies. La posibilidad de la existencia de biotipos y razas ha sido informada por diferentes investigadores (18).

Estudios recientes han propuesto que cuando ocurren infecciones naturales, la selección mutua produce un balance dinámico entre la bacteria y los nematodos formadores de agallas, donde los niveles de infección son raramente supresivos (31). Sin em-

bargo, la introducción de un aislamiento exótico de *P. penetrans* con diferentes perfiles de adhesión, puede perturbar este balance, resultando en un incremento considerable de la proporción de juveniles infestivos y hembras infectadas, un incremento del rendimiento de las esporas y una alta supresión de las poblaciones de nematodos formadores de agallas (31). Carneiro *et al.* (32) encontraron una alta variabilidad entre aislamientos de *P. penetrans* procedentes de diferentes regiones geográficas frente a diferentes especies y poblaciones de *Meloidogyne*. Los aislamientos mostraron patogenicidad frente a *Meloidogyne incognita*, *M. arenaria* y *M. paranaensis* n. sp.; sin embargo, fueron incompatibles con *M. graminicola* Golden y Birchfield y *M. mayaguensis* Rammah. El aislamiento P8 de *P. penetrans*, cultivado dos veces en *M. javanica* (Treub) Chitwood fue más agresivo contra esta especie que contra su hospedante original *M. exigua* Goeldi. Estos resultados evidenciaron que las poblaciones de *Meloidogyne* pueden, algunas veces influir en la especificidad de hospedantes de los aislamientos de *P. penetrans*.

Se ha demostrado que la adhesión de las esporas a los juveniles varía en y entre las poblaciones de la bacteria. Esta variabilidad se ha atribuido a diferencias en la composición superficial de las diferentes especies, razas y poblaciones de nematodos, así como a la heterogeneidad de la superficie de las endosporas (17).

Una explicación para el aparente cambio del grado de especificidad es que las poblaciones de campo de *P. penetrans* son genéticamente heterogéneas, ocurriendo una selección cuando algunas endosporas que se adhieren mejor a una determinada población de nematodo produce grandes cantidades de endosporas que predominan en la próxima generación de ese aislamiento de la bacteria (24).

Una explicación alternativa para este fenómeno es que el nematodo hospedante induce una adaptación de la bacteria que se desarrolla en su interior, de forma tal que la progenie presenta una mejor habilidad para infectar un hospedante en particular (33).

La mayoría de los estudios se han enfocado en las interacciones de *P. penetrans* con los nematodos formadores de agallas que se reproducen partenogenéticamente *M. incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria* Chitwood. Recientemente las investigaciones han revelado que las endosporas también se adhieren a *M. hapla* (17), una especie que puede reproducirse por anfimixis.

Davies *et al.* (34), encontraron una diferencia interactiva específica entre *M. incognita*, que se reproduce por partenogénesis obligada, *M. hapla*, que se

reproduce por partenogénesis meiótica facultativa y *P. penetrans*. Los resultados sugieren que la progenie derivada de un juvenil individual puede diferir en la adhesión de las esporas en especies de nematodos sexuales y asexuales, lo cual indica que los mecanismos especiales que producen estas diferencias funcionales en la superficie de la cutícula pueden haber evolucionado en los nematodos sexuales y asexuales como una estrategia para evadir las infecciones por el hiperparásito.

La naturaleza de la adhesión de las esporas de *P. penetrans* a las superficies de los juveniles de *Meloidogyne* (J_2) no ha sido completamente dilucidada, aun cuando numerosas investigaciones han estado encaminadas a explicar los procesos asociados a la unión inicial de las endosporas a sus respectivos hospedantes (33).

En este sentido, las pruebas de adhesión y de infectividad han demostrado la especificidad de adhesión de las endosporas a la cutícula de los nematodos (35). Los pre-tratamientos de los juveniles de *Meloidogyne* spp., y de las endosporas de *P. penetrans* con una lectina aglutinina de germen de trigo y diferentes enzimas como proteasas, muramidasa y peptinasas, redujeron la adhesión de las endosporas a los J_2 , demostrándose la implicación de carbohidratos y proteínas en el proceso de adhesión. Los estudios han conducido a un modelo donde un carbohidrato presente en la superficie de la endospora se une a una lectina receptora que se encuentra en la cutícula del nematodo hospedante. Se piensa que las fibras que rodean el centro de la endospora son las responsables de la adhesión. Estas fibras son glicoproteínas solubles, reconocidas como beta mercaptoetanol (BME), que contienen altos niveles de N-acetilglucosamina (36). Este compuesto está presente en la superficie de la espora y se ha encontrado involucrada en la adhesión, interactuando con un receptor de la cutícula de los nematodos (37). No obstante, la naturaleza de los receptores de la cutícula de los nematodos para la adhesión de *P. penetrans* es ambigua (36), por lo que se requieren de otros análisis moleculares de los componentes de la cutícula de los nematodos involucrados en el proceso de adhesión para dilucidar estos mecanismos de manera más detallada. Por su parte, Preston *et al.* (38), informaron la distribución de un epitopo asociado a la adhesión sobre polipéptidos de diferentes aislamientos de *Pasteuria* que proporcionó avances para diferenciar especies y biotipos con preferencias de hospedantes específicos.

Kariuki *et al.* (2) demostraron que el número de endosporas adheridas a los juveniles infestivos resultan importante para la penetración de estos a la raíz, así como también en la fecundidad de los nematodos.

Duponnois *et al.* (39), caracterizaron aislamientos de *P. penetrans* de diferentes regiones climáticas por la heterogeneidad de la superficie de las endosporas utilizando anticuerpos monoclonales y por la habilidad de las endosporas de adherirse a diferentes poblaciones de *Meloidogyne* spp. Estos autores no encontraron una clara relación entre la heterogeneidad de la superficie de las endosporas de los aislamientos de *P. penetrans* y su habilidad para adherirse a la cutícula de diferentes poblaciones de *Meloidogyne* y el nivel de control obtenido.

Según Carneiro *et al.* (32) la adhesión de las esporas a los juveniles no implica necesariamente la infección y por tanto no puede ser este el único criterio para evaluar la eficacia de los aislamientos, aun cuando este es obviamente, un paso importante en este proceso. La evaluación del porcentaje de hembras infectadas con *P. penetrans* es la mejor aproximación para medir la disminución de las poblaciones de *Meloidogyne* spp., por este agente de biocontrol y constituye un criterio para la selección de aislados altamente patogénicos (40).

Función de la bacteria en los suelos supresores de nematodos

Algunos suelos son inhóspitos para los patógenos de plantas, limitando su supervivencia o crecimiento. Tales suelos son conocidos como suelo supresores de patógenos o enfermedades y se han encontrado en numerosas partes del mundo. La supresión ha sido definida como general o específica. En la supresión general, a menudo se reduce el ataque de hongos y nematodos. En la específica, el establecimiento de un solo cultivo (monocultivo) puede conducir a un incremento inicial de la enfermedad seguido de una declinación espontánea de la misma.

La supresión del suelo inducida por *P. penetrans* depende de la concentraciones de esporas y se manifiesta en el nivel de penetración de los J₂ y de la pérdida de fecundidad del nematodo (2). Se ha observado que en los suelos altamente infestados por nematodos que contienen *P. penetrans* comienzan a disminuir las densidades poblacionales en la medida en que se incrementa la población de la bacteria. Como consecuencia, el suelo se convierte finalmente en un suelo supresor. Cetintas y Dickson (41) informaron un incremento poblacional de *P. penetrans* sobre *M. arenaria* en un periodo de cuatro años y demostraron el alto nivel de supresividad de un suelo naturalmente infestado por este nematodo con la presencia de *P. penetrans*.

Es importante destacar que las concentraciones de endosporas de *P. penetrans* en el ambiente del suelo es una clave importante para entender la función que desempeña este organismo en los suelos supresores. Kariuki *et al.* (2) estudiaron el efecto de la cantidad de

esporas adheridas en la cutícula de los J₂ de *M. arenaria* sobre el grado de penetración de estos a la raíz de una planta hospedante y encontraron que en la medida en que aumenta el nivel de adhesión de las esporas a los J₂ la penetración de estas larvas a la raíz decrece. Solamente fue necesario la adhesión de 3,5 esporas por J₂ para reducir la habilidad de *M. arenaria* para penetrar la raíz. Estos resultados dan valor a la hipótesis de que *P. penetrans* induce la supresividad del suelo mediante la interferencia con la penetración de los J₂ a sus hospedantes (24).

ECOLOGÍA

Existe variabilidad en la efectividad de las poblaciones de *P. penetrans* procedentes de diversas regiones y condiciones agroclimáticas sobre diferentes poblaciones de nematodos. Varios factores abióticos y bióticos están implicados en la actividad de *P. penetrans* para controlar a sus hospedantes.

Temperatura

La temperatura es el factor de mayor importancia en las interacciones que ocurren entre *P. penetrans* y sus hospedantes. Esta afecta la adhesión y germinación de las esporas, la patogenicidad y el completamiento del ciclo de vida de la bacteria en el pseudoceloma de los nematodos.

La bacteria y el nematodo responden de forma diferente a la temperatura y muestran una divergencia en cuanto a sus umbrales de temperatura basal y a su tasa de crecimiento. Así, la bacteria no produce esporas por debajo de 20°C, pero por encima de este umbral, la producción de esporas es mucho más rápida que la producción de huevos por parte del nematodo (30). Esta divergencia en la respuesta a la temperatura entre la bacteria y el nematodo tiene importantes implicaciones epidemiológicas, ya que la eficacia de *P. penetrans* como agente de control biológico a temperaturas próximas a 20°C será limitada puesto que su tasa de crecimiento es mucho más lenta que la del nematodo. Este hecho explicaría la mayor abundancia de la bacteria en zonas tropicales y subtropicales, con temperaturas medias más altas que en zonas de clima templado. La temperatura óptima para la adhesión de las endosporas y el desarrollo de *P. penetrans* sobre *M. incognita* y *M. arenaria* es de 25-30°C (28, 30), mientras que entre 15 y 20°C ocurren los más bajos niveles de adhesión y desarrollo (30). Por su parte Freitas (42), observó que los juveniles infestivos de *M. arenaria* no presentaron endosporas adheridas a sus cutículas después de ser incubados en un suelo infestado por *P. penetrans* a 10°C ó a 50°C por cuatro días, pues las temperaturas extremas, desfavorables para

el movimiento de los nematodos, pueden prevenir el contacto entre los dos organismos. La propia receptividad de la cutícula de los nematodos a las endosporas es afectada por la temperatura. Freitas *et al.* (43), incubaron J_2 de *M. arenaria* a diferentes temperaturas y constataron que la mayor cantidad de endosporas se adhirieron a los J_2 cuando estos fueron expuestos previamente a 30-35°C y que la adhesión decrece a 45°C, hasta llegar a un mínimo después de la incubación a 50°C. Tal decrecimiento es probablemente el resultado de una solubilización o desnaturalización de los ligamentos presentes en la cutícula de los nematodos (36).

Darban *et al.* (44), estudiaron el efecto de diferentes esquemas de temperatura sobre el desarrollo de *P. penetrans* y el número de endosporas producidas. Estos autores encontraron que a temperatura constante de 26°C, el hiperparásito se reproduce más rápidamente y las esporas alcanzan el estado de madurez más tempranamente que cuando las temperaturas fluctúan entre este rango.

Recientemente se ha podido comprobar que el mayor grado de adhesión de las esporas y desarrollo de *P. penetrans* se alcanza a las temperaturas óptimas para el desarrollo de los nematodos y su planta hospedante (45). Estos estudios cobran una mayor trascendencia en los sistemas de producción *in vivo* de *P. penetrans*, ya que si el objetivo es la producción masiva de endosporas, mantener el sistema de producción a las temperaturas óptimas para el crecimiento y desarrollo de la planta hospedante puede proporcionar un mejor crecimiento y desarrollo de la bacteria.

Suelo

La textura y estructura, así como la matriz del suelo son factores importantes que actúan sobre el flujo y absorción de las esporas. Dabiré *et al.* (29), sugieren que las relaciones parasíticas entre *P. penetrans* y sus hospedantes no solo están regidos por procesos denso dependientes como avizoraron Ciancio y Bourijate (46), sino que también el suelo y el régimen hídrico desempeñan una función importante en estas relaciones.

En estudios de prospecciones la ocurrencia natural de *P. penetrans* estuvo algunas veces correlacionada con el tipo de suelo: por ejemplo, fue menos frecuente en suelos arenosos en Senegal (31) y más frecuente en suelos loam arenosos en Sudáfrica (47). Dabiré y Mateille (48), recomendaron que el suelo ideal para el mejor balance de absorción y retención de las esporas de *P. penetrans* eran los suelos arenosos con un 10-30 % de arcilla. Las interacciones que ocurren en este suelo podrían ejercer un control directo sobre la dispersión y la capacidad de adhesión de las esporas a las cutículas de los nematodos.

A pesar de que la mayoría de las veces, *P. penetrans* ha sido encontrada en los suelos con textura arenosa, también ha sido encontrada en otros tipos de suelos, muchos de ellos considerados supresores por la presencia de esta bacteria (42, 47). Sin embargo, 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. Las propiedades abióticas (capacidad de retención del agua, aireación) de los suelos areno-arcillosos proporcionan una mayor infección de los juveniles y desarrollo de *P. penetrans* que los suelos arenosos (48).

La estructura del suelo desempeñan una función clave no solamente en la dispersión de las esporas de *P. penetrans* sino también en la movilidad de los juveniles (48,49). Es posible que el movimiento de los nematodos en el perfil del suelo sea uno de los factores más importantes que favorezcan la adhesión de las endosporas a sus cutículas, donde los J_2 más activos tienen una mayor probabilidad de ponerse en contacto con las endosporas. Se conoce que las endosporas descienden con la percolación del agua, de ahí que se incrementa la oportunidad de contacto con los J_2 (1).

De igual manera, las alteraciones de las características intrínsecas del suelo, pueden favorecer el control biológico de nematodos por la bacteria. Las tácticas culturales como la irrigación, preparación del suelo, pueden mejorar la distribución de las esporas en el campo, aumentando las oportunidades de contacto entre ambos organismos.

Humedad y pH

Es muy escasa la información acerca de la influencia de la humedad y el pH sobre la adhesión de las endosporas y el desarrollo de *P. penetrans*, pero se conoce que las endosporas son resistentes a la desecación. La actividad de los nematodos en el suelo se afecta en gran medida por las condiciones hídricas (50), 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. Sin embargo, los estudios sobre la humedad del suelo y la adhesión de las esporas han producido resultados variables.

Se ha planteado que la adhesión de las esporas de *P. penetrans* a los juveniles infestivos de *M. incognita* se incrementa con el aumento de la humedad del suelo. El por ciento de esporas adheridas fue menor cuando el suelo presentó una humedad por debajo del 10% que cuando estuvo por encima del 25% (48). Dabiré y Mateille (48), informaron que en suelos arenosos, caracterizados por la baja capacidad de retención del agua, una irrigación de 25 mL.día⁻¹ no proporcionó su-

ficiente humedad para el incremento de las poblaciones de *M. javanica*, aunque todos los J_2 se contabilizaron con esporas adheridas. Por otra parte, cuando este suelo fue irrigado adecuadamente las poblaciones de este nematodo se incrementaron y a su vez se incrementó el número de esporas adheridas a sus cutículas. Cuando el suelo fue intensamente irrigado las esporas se perdieron debido a su dilución y percolación a la profundidad.

Los efectos del pH sobre *P. penetrans* son diversos y de difícil interpretación. Sin embargo, al parecer el pH favorable para la adhesión de las endosporas a los nematodos hospedantes oscila de neutro a alcalino. Según O'Brien (51), la adhesión de las endosporas de *P. penetrans* a las cutículas de los juveniles infestivos de *M. incognita* y *M. arenaria* no fue afectada por el pH entre 4,5 y 8,5. Ratnasoma y Gowen (52), obtuvieron una mayor adhesión de las endosporas extraídas de hembras infectadas y suspendidas en agua con pH 8, que cuando usaron suspensiones de endosporas provenientes de polvo de raíces en agua con pH 3,8.

Afolabi *et al.* (53), estudiaron el potencial electrostático de *P. penetrans* y encontraron que las endosporas tienen cargas negativas, donde la mayor carga negativa ocurre en pH 7 y se reduce en la medida en que el pH se aleja de la neutralidad. Como los nematodos también tienen cargas negativas, se esperaba que existiera una repulsión entre las endospora y los nematodos, sin embargo ocurre una adhesión natural entre estos organismos.

De estos resultados se puede concluir que otras fuerzas, como fuerzas hidrofóbicas de atracción y electrostáticas de repulsión, se encuentran involucradas en el proceso de reconocimiento y adhesión de las endosporas a las cutículas de los nematodos y que la función del pH todavía necesita ser elucidada.

PRODUCCIÓN MASIVA DE *P. penetrans*

Existen problemas prácticos y técnicos asociados a la reproducción masiva de *P. penetrans* para su uso en campo. El mayor impedimento para su uso comercial como producto para el control de nematodos ha sido la imposibilidad de su crecimiento en ausencia del nematodo hospedante, impidiendo su uso a gran escala con métodos de bajos costos de producción (9).

Recientemente se ha informado la reproducción masiva *in vitro* de varias cepas de *Pasteuria* en fermentación líquida utilizando un medio de cultivo que contiene tejidos viables del nematodo *Belonolaimus longicaudatus* Rau y que puede ser utilizada también para el control de especies de *Meloidogyne* (54).

Se han estudiado diferentes métodos para la reproducción de la bacteria; sin embargo, en todos estos estudios los principales factores que afectan el número de endosporas producidas son: la densidad del inóculo del nematodo, la especie de planta y el momento de recobrado de las endosporas.

Verdejo y Jaffee (55), cultivaron la bacteria sobre *M. javanica* en cultivos de tejidos de raíces transformadas con *Agrobacterium rhizogenes*, pero solo se reprodujo una generación de endosporas. Las cutículas de las hembras infectadas no llegaron a romperse y por lo tanto las endosporas no se liberaron para iniciar un nuevo ciclo.

La reproducción de *P. penetrans* actualmente se realiza *in vivo* sobre las raíces de un cultivo susceptible infestadas por *Meloidogyne* sp. Para ello es necesario mantener las poblaciones de nematodos sobre un cultivo hospedante en macetas donde se inocula la bacteria para su multiplicación. Las raíces infectadas se extraen de la maceta, se secan al sol y se muelen (22). Este polvo es el que se utiliza para la aplicación al campo. Un gramo de polvo de raíz puede contener aproximadamente 70-80 millones de endosporas. Con niveles de aplicación de 10^6 endosporas.kg de suelo⁻¹ se obtiene alrededor del 95% de efectividad en el control de las poblaciones de *Meloidogyne* spp., con un incremento del 30 % en los rendimientos de los cultivos (56). Carneiro *et al.* (40), obtuvieron altos niveles de control de *M. incognita* en café e incrementaron los niveles de *P. penetrans* en el tiempo, utilizando pequeñas cantidades del polvo de raíces (0,5-5 g.planta⁻¹), con una concentración de 10^6 y 10^7 endosporas por semillero.

Sharma y Stirling (57) recomendaron un periodo de colecta de las endosporas maduras entre 7-8 semanas a temperaturas de 20-30 °C, basados en los estudios realizados por Stirling (28). El rendimiento de las esporas es generalmente expresado en términos del número de esporas por peso seco de raíz y dependerá del número de nematodos infectados por *P. penetrans* en el sistema radical.

Darban *et al.* (4), informaron que a través de la reproducción en sistemas *in vivo* en casas de cristal se puede obtener una producción máxima de endosporas superior a 2×10^6 esporas.hembra⁻¹ y que la producción de esporas depende de la duración del crecimiento de las hembras de nematodo hospedante, la cual continúa incrementado su tamaño a partir de las 12 semanas si la planta hospedante se mantiene saludable. Estos autores concluyen que para lograr altas producciones de endosporas es mejor mantener las condiciones óptimas de temperatura para el sistema de pro-

ducción del cultivo hospedante que para el crecimiento y desarrollo del hiperparásito.

POTENCIALIDADES DE *P. penetrans* EN EL MANEJO DE *Meloidogyne* spp.

El manejo de los nematodos formadores de agallas es extremadamente difícil. Según Whitehead (58), se requiere de un 99,9 % de control para prevenir un incremento poblacional a niveles de daño, debido a que las especies de *Meloidogyne* poseen un alto potencial reproductivo y un amplio rango de hospedantes. Las pérdidas en cultivos como el tomate pueden ocurrir cuando las densidades poblacionales se encuentran en un rango de 0,1-1,0 nematodo por cm³ de suelo (59). Gowen *et al.* (60) observaron que las aplicaciones de *P. penetrans* pueden no ejercer un buen control cuando las condiciones son favorables para la reproducción del nematodo pero esta puede ser muy útil cuando se usa en combinación con otras tácticas de manejo.

Según Stirling (61), existen dos estrategias de aplicación de *P. penetrans* en el campo para el control de nematodos de agallas: la forma inundativa, que consiste en aplicaciones frecuentes y en grandes números de endosporas para reducir una población de nematodo de forma directa e inmediata. Esta estrategia requiere de medios más rápidos y baratos para la reproducción masiva de la bacteria. La otra forma de aplicación es la inoculativa, en la que se aplica al campo un número relativamente bajo de endosporas y ocurre un crecimiento rápido de sus densidades poblacionales en el suelo.

Para las aplicaciones inundativas es necesario seleccionar poblaciones de *P. penetrans* con amplio espectro de hospedantes o aplicar mezclas de aislamientos variados para contraponer la diversidad de poblaciones de nematodos de agallas, frecuentemente en el suelo (62). Esta especificidad debe tenerse en cuenta en la forma de aplicación inoculativa, ya que se requiere de más tiempo para que ocurra la selección natural, de esta forma las endosporas específicas para una determinada población de *Meloidogyne* presente en un área dada, se multiplicaran en su progenie y será más eficiente en el control de las diversas poblaciones de *Meloidogyne* spp.

En ambas estrategias, el polvo de raíces puede ser aplicado directamente al suelo e incorporado con algún implemento agrícola, en suspensiones acuosas aplicado sobre la superficie del suelo con pulverizador manual o motorizado, o a través del agua de riego.

Pasteuria penetrans se puede aplicar en combinación con productos químicos sintéticos para el control de nematodos (25). Sin embargo, no en todos los casos, la viabilidad de las esporas adheridas a la cutícula de los nematodos ha sido estudiada. La adhesión de las esporas después de haber sido expuestas a nematicidas químicos, no implica que estas germinen, penetren o colonicen a los nematodos, dando lugar a la formación de nuevas endosporas (42).

Los nematicidas organofosforado y carbamato tienen a tener acción nematostática más que nematicida y a bajos niveles de aplicación generalmente ayudan al control biológico prolongando la exposición de los nematodos a sus antagonistas. Brown y Nordmeyer (63), demostraron que ocurre una reducción sinérgica de las agallas inducidas por *M. javanica* con el uso conjunto de *P. penetrans* y los productos químicos carbofuran y aldicarb. En este estudio el carbamato se utilizó a bajas concentraciones por lo que los autores sugirieron que esto pudo haber afectado el comportamiento de los nematodos incrementándose su movilidad en el suelo y por tanto las probabilidades de contacto con las esporas de la bacteria.

Kariuki y Dickson (2) demostraron que el fumigante 3-dicloropropeno (1,3-D) no produjo efectos adversos a la bacteria sin embargo, si lo tuvo la aplicación al suelo de cloropicrina. Las diferencias obtenidas entre los tratamientos con 1,3-D y *P. penetrans* con los no tratados pueden estar atribuidos cuando el 1,3-D es aplicado al suelo, ya que muere un alto porcentaje de juveniles infestivos presentes en los primeros 0-20 cm de profundidad, limitando de esta forma el desarrollo del hiperparásito. Sin embargo, la cloropicrina interfiere con el desarrollo de *P. penetrans* dentro de las hembras de *M. arenaria*. Freitas *et al.* (55), no encontraron ninguna hembra de *Meloidogyne* spp. con endosporas de *P. penetrans* cuando se aplicó cloropicrina en un 100 % o en un 33 % bajo mantas de polietileno en el cultivo del tomate. El modo de acción exacto de la cloropicrina sobre *P. penetrans* no se ha dilucidado hasta el momento.

El uso de *P. penetrans* con microorganismos ha dado muestras prometedoras para el desarrollo del control biológico de nematodos. La aplicación de *P. penetrans* con hongos nematófagos ha tenido éxito en la disminución de la multiplicación de los nematodos, así como también en el mejoramiento de las condiciones que favorecen el crecimiento de los cultivos.

Los efectos aditivos y sinérgicos de *P. penetrans* y hongos nematófagos para el control de nematodos formadores de agallas fue constatado en casas de ve-

getación y en campo. De Leij *et al.* (64) observaron que *P. penetrans* y *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare y Gams tienen modos de acción complementarios, ya que el hongo afecta las hembras y huevos y la bacteria actúa sobre los juveniles infestivos que consiguen escapar a la acción del hongo.

De igual forma Talavera *et al.* (65) 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 el aumento del crecimiento del cultivo del tomate y su tolerancia a las infestaciones por estos nematodos. El efecto de la tolerancia de los cultivos hospedantes de *M. incognita* con las aplicaciones de *Glomus* sp. ha sido informado por numerosos investigadores. Gómez *et al.* (66), sugieren que la micorrización a través de la peletización de la semilla, pudiera proporcionar una mayor tolerancia de los cultivos susceptibles a *M. incognita*, debido a que, aun cuando estos nematodos aumentaron sus poblaciones en las raíces del cultivo hospedante, la micorrización favoreció la capacidad de exploración de las raíces en el suelo, la adsorción de nutrientes y el crecimiento vegetativo del cultivo. Es posible que estas interacciones también favorezcan el contacto de *P. penetrans* con sus hospedantes en el suelo al haber mayor disponibilidad de larvas a las cuales adherirse.

Algunas bacterias de la rizofora también pueden promover el desarrollo *P. penetrans* y su efecto antagonista contra los nematodos formadores de agallas. Estos organismos pueden modificar la estructura del exosporium relacionada con sus características hidrofóbicas, incrementando la adhesión de las esporas de *P. penetrans* a la cutícula de los nematodos. En este sentido Dabiré *et al.* (49) informaron que la proporción de juveniles infectados con *P. penetrans* se incrementó en un suelo inoculado con *Pseudomonas mendocina* Palleroni.

El efecto potencial del uso de enmiendas orgánicas y *P. penetrans* ha sido evaluado con diversos resultados. Las aplicaciones de material orgánico al suelo no siempre brindaron un efecto positivo con respecto a la bacteria, sin embargo, Javed *et al.* (5) demostraron que el efecto combinado de la aplicación de dos formulaciones de nim (*Azadirachta indica* A. Juss) (hojas y pasta) con *P. penetrans* resultaron favorables para obtener un control efectivo de poblaciones de *M. javanica* en tomate hasta un tercer ciclo de este cultivo. En este sentido las aplicaciones de nim favorecieron el crecimiento de los cultivos debido al efecto aditivo de la materia orgánica, toda vez que la bacteria

incrementó su población asegurando la disminución de la población del nematodo formador de agalla.

La solarización del suelo con plástico transparente inactiva los nematodos presentes en las capas superficiales del suelo, pero en las capas más profundas los juveniles infestivos de *Meloidogyne* spp., tienden a aumentar su actividad y movimiento (67). Este efecto resulta ser mejor para el contacto y adhesión de las endosporas de *P. penetrans* a los juveniles infestivos y se ha comprobado que los suelos solarizados permiten el aumento de las densidades poblacionales de la bacteria sin un aumento de las densidades poblacionales del nematodo hospedante (68). Durante un experimento de campo en la Florida, Freitas (42) observó que la temperatura media diaria del suelo de 41°C a 20 cm de profundidad no tuvo un efecto perjudicial sobre *P. penetrans* posibilitando el uso de este método conjuntamente con la bacteria.

Por otro lado, se debe tener especial cuidado cuando se combina la solarización con la adición de materiales orgánicos (biosolarización), pues no siempre el resultado es favorable para que ocurra la adhesión de las endosporas de la bacteria a la cutícula de los nematodos. La biosolarización acelera la descomposición de los residuos orgánicos y libera productos tóxicos como alcoholes, aldehídos e isotiosanatos (en el caso de las brassicáceas) que actúan como nematocidas pero también son perjudiciales para el desarrollo de *P. penetrans* (42). Es posible que además de los efectos de los diferentes compuestos que se liberan durante el proceso de descomposición de la materia orgánica en el suelo, existan otros mecanismos que están implicados en el proceso de reconocimiento y parasitismo de la bacteria a sus hospedantes.

CONSIDERACIONES GENERALES

En la actualidad un gran número de proyectos de investigación están encaminados en lograr el desarrollo de tácticas que permitan el manejo de las poblaciones de nematodos formadores de agallas en diversos agroecosistemas a nivel mundial. La aplicación del control biológico como única medida de manejo no propiciará la disminución de las poblaciones de nematodos por debajo del umbral de daño económico; es necesaria la integración armónica e inteligente de diferentes tácticas de manejo. Sin embargo, lograr este objetivo es extremadamente difícil debido a las irregularidades y variaciones producidas por la influencia de muchos factores que interactúan con los nematodos, sus hospedantes y sus enemigos naturales en los diversos tipos de suelo. La carencia de conocimiento detallado de estas interacciones es el principal factor que

limita el uso efectivo de los agentes de control biológico para el manejo de los nematodos.

Pasteuria penetrans ha demostrado su efectividad en la regulación de poblaciones de *Meloidogyne* spp. en diversos agroecosistemas. El método de reproducción *in vivo*, ha proporcionado las cantidades de esporas necesarias para realizar los estudios que hasta el presente han demostrado las potencialidades de *P. penetrans* como agente biocontrol, tanto en condiciones de laboratorio como microparcels, y para entender parte de los mecanismos que intervienen en las interacciones con sus hospedantes en el suelo. Sin embargo, a pesar de las dificultades para ser reproducida *in vitro*, que han retardado su desarrollo a mayor escala, las investigaciones realizadas hasta el presente avizoran su desarrollo eminente como un bioproducto comercial de gran efectividad sobre los nematodos fitoparásitos de mayor importancia económica a nivel mundial.

En Cuba los estudios de prospección de esta bacteria no se han desarrollado pero se conoce de su existencia en algunos suelos de la provincia Ciudad de La Habana donde fue encontrada parasitando *M. incognita* en hortalizas y ornamentales (Gandarilla Hortensia, comunicación personal)¹, sin el desarrollo de investigaciones posteriores. Basados en estos hallazgos y en la insuficiencia de agentes de control biológico en Cuba, unido a la necesidad de buscar nuevas alternativas de manejo amigables con el ambiente, es necesario incrementar los estudios de prospección y selección de poblaciones autóctonas de la bacteria con vistas a su futura incorporación a las estrategias de manejo de nematodos desarrolladas en el país, donde *Meloidogyne* spp., representa una de las plagas de mayor importancia económica. Este artículo es una contribución al conocimiento de *P. penetrans* para el desarrollo de este agente de biocontrol en Cuba.

REFERENCIAS

1. Cetintas R, Dickson DW. Distribution and Downward Movement of *Pasteuria penetrans* in Field Soil. *J Nematol.* 2005;37(2):155-160.
2. Kariuki GM, Dickson DW. Transfer and Development of *Pasteuria penetrans*. *J Nematol.* 2007;39(1):55-61.
3. Tian B, Yang J, Zhang K-Q. Transfer and Development of *Pasteuria penetrans*. *J Nematol.* 2007;39(1):55-61.
4. Darban DA, Pembroke Barbara, Gowen SR. The relationships of time and temperature to body weight and numbers of endospores in *Pasteuria penetrans*-infected *Meloidogyne javanica* females *Nematology.* 2004;6(1):33-36.
5. Javed N, El-Hassan S, Gowen S, Pembroke Barbara, Inam-ul-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.
6. Hewlett TE, Cox R, Dickson DW, Dunn RA. Occurrence of *Pasteuria* spp. in Florida. Supplement to *Journal of Nematology.* 1994;26(4S):616-619.
7. Stirling GR. Biological control of plant parasitic nematodes. En: Poinar GO, Jansson HB, editors. *Diseases of nematodes*, vol. II. Boca Raton, FL: CRC Press; 1988. p. 93-139.
8. Chen ZX, Dickson DW. Review of *Pasteuria penetrans*: Biology, ecology, and biological control potential. *J Nematol.* 1998;30:313-340.
9. Bishop AH, Ellar DJ. Attempts to culture *Pasteuria penetrans in vitro*. *Biocontrol Sci Tech.* 1991;1:101-114.
10. Bird DM, Opperman CH, Davies KG. Interactions between bacteria and plant-parasitic nematodes: now and then. *Int J Parasitol.* 2003;33:1269-1276.
11. Cobb NA. *Fungus maladies of the sugar cane*, with notes on associated insects and nematodes. 2nd ed. Honolulu: Hawaiian Sugar Planters Association 1906.
12. Micoletzky H. *Die freilebenden Susswasser und Moornematoden Danemarks.* Copenhagen: Host and Son. 1925.
13. Mankau R. *Bacillus penetrans* n. comb. causing a virulent disease of plant-parasitic nematodes. *J Invertebr Pathol.* 1975;26:333-339.
14. Metchnikoff, E. *Pasteuria ramosa*, un représentant des bactéries à division longitudinale. *Ann l'Institut Pasteur.* 1888;2:165-170.

¹ Dra. Hortensia Gandarilla. Laboratorio de Nematología. Laboratorio Central de Cuarentena. Ciudad de La Habana. Cuba.

15. Charles L, Carbone I, Davies KG, Bird D, Burke M, Kerry BR, et al. Phylogenetic Analysis of *Pasteuria penetrans* by Use of Multiple Genetic Loci. *J Bacteriol.* 2005;187(16):5700-5708.
16. Davies KG. Interactions between nematodes and microorganisms: bridging ecological and molecular approaches. *Adv Appl Microbiol.* 2005;57:53-78.
17. Sayre RM, Starr MP, Golden AM, Wergin WP, Endo BY. Comparison of *Pasteuria penetrans* from *Meloidogyne incognita* with a related mycelial and endospore-forming bacterial parasite from *Pratylenchus brachyurus*. *Proc Helminthol Soc Wash.* 1988;55:28-49.
18. Sayre RM, Wergin WP, Schmidt JM, Starr MP. *Pasteuria nishizawae* sp. nov., a mycelial and endospore-forming bacterium parasitic on cyst nematodes of genera *Heterodera* and *Globodera*. *Res Microbiol.* 1991;142:551-564.
19. Giblin-Davis R M, Williams DS, Bekal S, Dickson DW, Brito JA, Becker JO, Preston JF. Candidatus *Pasteuria usgae* sp. nov., an obligate endoparasite of the phytoparasitic nematode *Belonolaimus longicaudatus*. *Internat J Syst Evol Microbiol.* 2003;53:197-200.
20. Bishop AH, Gowen SR, Pembroke Barbara, Trotter JR. Morphological and molecular characteristics of a new species of *Pasteuria* parasitic on *Meloidogyne ardenensis*. *J Invertebr Pathol.* 2007;96:28-33.
21. Dong LQ, Zhang KQ. Microbial control of plant-parasitic nematodes: a five-party interaction. *Plant Soil.* 2006;288:31-45.
22. Stirling GR, Wachtel MF. Mass production of *Bacillus penetrans* for the biological control of root-knot nematodes. *Nematologica.* 1980;26:308-312.
23. Channer AG, Gowen R. Selection for increased host resistance and increased pathogen specificity in the *Meloidogyne-Pasteuria penetrans* interaction. *Fund Appl Nematol.* 1992;15:331-339.
24. Davies KG, Fargette M, Balla G, et al. Cuticle heterogeneity as exhibited by *Pasteuria* spore attachment is not linked to the phylogeny of parthenogenetic root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.). *Parasitology.* 2000;122:111-120.
25. Stirling GR. Biological control of *Meloidogyne javanica* with *Bacillus penetrans*. *Phytopathology.* 1984;74:55-60.
26. Rao SM, Kerry BR, Gowen SR, Buorne MJ, Reddy P. Management of *Meloidogyne incognita* in tomato nurseries by integration of *Glomus deserticola* with *Verticillium chlamydosporium*. *J Plant Dis Protection.* 1997;105(1):58-63.
27. Kariuki GM, Brito JA, Dickson DW. Effects of *Pasteuria penetrans* endospore rate of attachment on root penetration and fecundity of *Meloidogyne arenaria* Raza 1. *Nematropica.* 2006;36(2):261-267.
28. Stirling GR. Effect of temperature on infection of *Meloidogyne javanica* by *Bacillus penetrans*. *Nematologica.* 1981;27:458-462.
29. Dabiré KR, 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 Weld. *Biological Control.* 2007;40:22-29
30. Hatz B, Dickson DW. Effect of temperature on attachment, development, and interaction of *Pasteuria penetrans* on *Meloidogyne arenaria*. *J Nematol.* 1992;24:512-521.
31. Trudgill DL, Bala G, Blok VC, Daudi A, Davies KG, Gowen SH, et al. The importance of tropical root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) and factors affecting the utility of *Pasteuria penetrans* as a biocontrol agent. *Nematology.* 2000;2:823-845.
32. Carneiro, Regina MDG, Tigano MS, Lopes Jorge C, Oliveira Teixeira AC, Cordeiro MC. Selection and polymorphism of *Pasteuria penetrans* isolates in relation to *Meloidogyne* spp. from coffee. *Nematology.* 2004;6:37-47.
33. Oostendorp M, Dickson DW, Mitchell DJ. Host range and ecology of isolates of *Pasteuria* spp. from the southeastern United States. *J Nematol.* 1990;22:525-531.
34. Davies KG, Rowe JA, Williamson VM. Inter- and intra-specific cuticle variation between amphimictic and parthenogenetic species of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) as revealed by a bacterial parasite (*Pasteuria penetrans*). *Internat J Parasitol.* 2008;38:851-859.

35. Brito JA, Preston JF, Dickson DW, Giblindavis RM, Williams DS, Aldrich HC, et al. Temporal formation and immunolocalization of an endospore surface epitope during *Pasteuria penetrans* sporogenesis. *J Nematol.* 2003;35:278-288.
36. Davies KG, Danks C. Carbohydrate/protein interaction between the cuticle of infective juveniles of *Meloidogyne incognita* and spores of the obligate hyperparasite *Pasteuria penetrans*. *Nematologica.* 1993;39(1):53-54.
37. Mohan S, Fould S, Davies KG. The interaction between the gelatin-binding domain of fibronectin and the attachment of *Pasteuria penetrans* endospores to nematode cuticle. *Parasitology.* 2001;123:271-276.
38. Preston JF, Dickson DW, Maruniak JE, Brito A, Schmidt LM, Giblin-Davis RM. *Pasteuria* spp. Systematics and phylogeny of these bacterial parasites of phytopathogenic nematodes. *J Nematol.* 2003;35:198-207.
39. Duponnois R, Fargette Mireille, Fould S, Thioulouse J, Davies KG. Diversity of the bacterial hyperparasite *Pasteuria penetrans* in relation to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) control on *Acacia holosericea*. *Nematology.* 2000;2(4):435-442.
40. Carneiro Regina MDG, De Mesquita Luiz FG, Cirotto Pedro AS, Mota Fabiane C, Almeida Maria Ritta A, Cordeiro Maria Céilia. The effect of sandy soil, bacterium dose and time on the efficacy of *Pasteuria penetrans* to control *Meloidogyne incognita* race 1 on coffee. *Nematology.* 2007;9(6):845-851.
41. Cetintas R, Dickson DW. Persistence and Suppressiveness of *Pasteuria penetrans* to *Meloidogyne arenaria* Race 1. *J Nematol.* 2004;36(4):540-549.
42. Freitas LG. The effects of soil solarization, organic amendment, and fumigant nematicides on *Pasteuria penetrans* and its infectivity to *Meloidogyne arenaria* race 1 in tomato. Ph.D. Dissertation. University of Florida; 1997. p. 156.
43. Freitas LG, Mitchell DJ, Dickson DW. Temperature effects on attachment of *P. penetrans* endospores to *Meloidogyne arenaria* race 1. *J Nematol.* 1997;29:547-555.
44. Darban DA, Gowen SR, Pembroke B, Mahar AN. Development of *Pasteuria penetrans* in *Meloidogyne javanica* females as affected by constantly high vs fluctuating temperature in an in-vivo system. *J Zhejiang Univ SCI.* 2005;6B(3):155-157.
45. Pembroke, B. Practical aspects relating to the use of *Pasteuria penetrans* for the management of root-knot nematodes. M. Phil. Thesis, Reading, UK, Department of Agriculture, The University of Reading; 2002. 92. pp.
46. Ciancio A, Bourijate M. Relationship between *Pasteuria penetrans* infection levels and density of *Meloidogyne javanica*. *Nematol. Medit.* 1995;23:43-49.
47. Spaull VW. Observations on *Bacillus penetrans* infecting *Meloidogyne* in sugarcane fields in South Africa. *Rev Nematol.* 1984;7(3):277-282.
48. 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;36:539-543.
49. Dabiré KR, Chotte JL, Fardoux J, Mateille T. New development in the estimation of spores of *Pasteuria penetrans*. *Biol Fert Soils.* 2001;33:340-343.
50. Van Gundy SD. 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; 1985 .p. 177-182.
51. O'Brien PC. Studies on parasitism of *Meloidogyne javanica* by *Bacillus penetrans*. *J Nematol.* 1980;4(12):234.
52. Ratnasoma HA, Gowen SR. Spore attachment of *Pasteuria penetrans* on juveniles of *Meloidogyne incognita* as affected by pH and organic matter. *Nematol Medit.* 1996;24(2):283-285.
53. Afolabi PK, Davies G, O'Shea PS. The electrostatic nature of the spore of *Pasteuria penetrans*, the bacterial parasite of root-knot nematodes. *J Appl Bacteriol.* 1995;79:244-249.

54. Hewlett T, Smith K, Waters J. The use of in vitro produced *Pasteuria* spp. for the control of phytopathogenic nematodes. Procedente CD Resumen del 2do Congreso Internacional de Nematología Tropical (ONTA); 2009 Oct. 4-9; Maceió Alagoas State, Brazil.
55. Verdejo S, Jaffee BA. Reproduction of *Pasteuria penetrans* in a tissue-culture system containing *Meloidogyne javanica* and *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots. *Phytopathology*. 1988;78:1284-1286.
56. Freitas LG, Dickson DW, Mitchell DJ, McSorley R. Suppression of *Meloidogyne arenaria* by *Pasteuria penetrans* in the field. *Nematol Bras*. 2000;24:147-156.
57. Sharma RD, Stirling GR. *In vivo* mass production systems for *Pasteuria penetrans*. *Nematologica*. 1991;37:483-484.
58. Whitehead AG. Sedentary endoparasites of Roots and Tubers (*Meloidogyne* and *Nacobbus*). En: *Plant Nematode Control*. CAB International. Wallingford, UK; 1998. p. 209-260.
59. Sikora RA, Fernández E. Nematode of vegetable. En: Luc M, Sikora RA, Bridge J, editors. *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. 2da Edición. CABI, UK; 2005. p. 319-392.
60. Gowen SR, Tzortzakakis EA, Channer AG. Control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Pasteuria penetrans* as influenced by the initial nematode population densities. *Nematologica*. 1998;44:369-379.
61. Stirling G.R. Biological control of plant parasitic nematodes: Progress, problems, and prospects. Wallingford, UK: CAB International; 1991.
62. Gómez, Lucila. Diagnóstico de nematodos agalleros y prácticas agronómicas para el manejo de *Meloidogyne incognita* en la producción protegida de hortalizas. Ph D Thesis, Universidad Agraria de La Habana, Cuba. CENSA; 2007. p. 94.
63. Brown SM, Nordmeyer D. Synergistic reduction in root galling by *Meloidogyne javanica* with *Pasteuria penetrans* and nematicides. *Rev Nematol*. 1985;8:285-286.
64. De Leij FAAM, Davies KG, Kerry BR. The use of *Verticillium chlamyosporium* Goddard and *Pasteuria penetrans* (Thorne) Sayre & Starr alone and in combination to control *Meloidogyne incognita* on tomato plants. *Fund Appl Nematol*. 1992;15(3):235-242.
65. Talavera M, Itou K, Mizukubo T. Combined application of *Glomus* sp. and *Pasteuria penetrans* for reducing *Meloidogyne incognita* (Tylenchida: Meloidogynidae) populations and improving tomato growth. *Appl Entomol Zool*. 2002;37(1):61-67.
66. Gómez Lucila, Rodríguez Mayra G, de la Noval Blanca, Miranda Ileana, Hernández M.A. Interacción entre ECOMIC® y una población cubana de *Meloidogyne incognita* en tomate. *Rev Protección Veg*. 2008;23(2):90-98.
67. Klein E, Katan J, Austerweil Miriam, Gamliel A. Controlled Laboratory System to Study Soil Solarization and Organic Amendment Effects on Plant Pathogens. *Phytopathology*. 2007;97(11):1477-1483.
68. Walker GE, Wachtel MF. The influence of soil solarisation and non-fumigant nematicides on infection of *Meloidogyne javanica* by *Pasteuria penetrans*. *Nematologica*. 1989;34:477-483.

(Recibido 30-5-2009; Aceptado 25-1-2010)