

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

ÁREA ACADÉMICA AGROFORESTAL

**PROGRAMA DE MAESTRÍA EN GESTIÓN DE RECURSOS
NATURALES Y TECNOLOGÍAS DE PRODUCCIÓN**

**“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”**

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN SOMETIDO AL TRIBUNAL
DEL ÁREA ACADÉMICA AGROFORESTAL DEL INSTITUTO
TECNOLÓGICO DE COSTA RICA PARA OPTAR POR EL GRADO
DE MAGISTER EN GESTIÓN DE RECURSOS NATURALES Y
TECNOLOGÍAS DE PRODUCCIÓN

ALEJANDRO RODRÍGUEZ MORALES
SUSTENTANTE

CAMPUS CARTAGO, COSTA RICA
2014

DEDICATORIA

A Dios Todopoderoso, que me dio todo lo necesario para alcanzar esta meta.

A mi amada esposa, Francesca, a mis hijos, Adrián y Carolina, quienes son mi principal inspiración para buscar ser mejor cada día.

A mi mamá, doña Mélida, por haber inculcado en mí buenos valores y apoyarme toda una vida.

A mis hermanos, Ana Patricia (*q.d.D.g.*), Rodrigo José, María Gabriela, José Guillermo y Mélida María, por haber estado ahí siempre que los necesité.

A mi papá, don Rodrigo (*q.d.D.g.*).

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional para Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT), por el apoyo financiero recibido; muy especialmente a la Sra. Elvia Araya Vargas, por el apoyo y amabilidad recibidos en todo momento.

A la CORPORACIÓN BANANERA NACIONAL (CORBANA), por el apoyo financiero recibido y por haberme brindado todas las facilidades para la realización de esta investigación; muy especialmente a su Junta Directiva, Gerencia General y Subgerencias y Depto. de Recursos Humanos.

Al Dr. Jorge Sandoval, por su apoyo brindado para la consecución de esta meta.

A mi tutora, Lidieth Uribe Lorío, Ph.D. haber compartido su experiencia y haberme apoyado y alentado durante toda la investigación.

Al Ing. Rooel Campos Rodríguez M.G.A., por sus consejos y la colaboración recibidos.

Al Ing. Randall Vargas Araya M.Sc. y a los compañeros de la Sección de Nematología Walter Jiménez Vargas y Jonathan Artavia Rivera, por su gran apoyo durante la realización de este experimento.

A mis compañeros del Laboratorio de Control Biológico, Juan Carlos Retana Guzmán y a Omar Gabriel Vega Molina, por su apoyo y dedicación puestos en todo momento.

A la profesora-investigadora Lorena Uribe Lorío M.Sc. por brindarme sus consejos y apoyo cada vez que lo solicité.

A mi compañera del Laboratorio de Biología Molecular, Biol. Ana María Conejo Barboza M.Sc., por toda su ayuda en la realización de los análisis moleculares.

Al profesor Fabio Blanco Rojas, por su colaboración en la realización de los análisis estadísticos y consejos para la realización de este estudio.

A la bacterióloga Yelenys Alvarado-Capó Ph.D., por sus sugerencias y consejos.

Al Programa de Maestría en Gestión de Recursos Naturales y Tecnologías de Producción del TEC, Al Ing. Rodolfo Canessa Mora M.Sc., a los estimados profesores y muy especialmente, al TAE Carlos E. Hernández Vásquez, por siempre estar pendiente de nuestras necesidades.

¡A todos, que Dios los bendiga!

Hoja de aprobación

Este Trabajo Final de Graduación fue aceptado por el Tribunal del Área Académica Agroforestal del Instituto Tecnológico de Costa Rica, como requisito parcial para optar por el grado de Magister en Gestión de Recursos Naturales y Tecnologías de Producción.

Dra. Lidieth Uribe Lorío
Profesora Tutora

M.G.A. Roel Campos Rodríguez
Lector

M.Sc. Rodolfo Canessa Mora
Presidente del Tribunal de Graduaciones

Alejandro Rodríguez Morales
Sustentante

2014

LISTA DE CONTENIDOS

DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
Hoja de aprobación	v
LISTA DE CONTENIDOS	vi
LISTA DE CUADROS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE ANEXOS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xv
RESUMEN	xvii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Introducción al tema.....	2
1.2 Justificación.....	4
1.3 Objetivo General.....	6
1.4 Objetivos Específicos.....	6
1.5 Hipótesis.....	6
1.6 Definición de términos.....	7
1.7 Definición de variables.....	14
1.8 Delimitaciones.....	16
1.9 Limitaciones.....	16
2. REVISIÓN DE LITERATURA	18
2.1 Importancia socio-económica del banano.....	19
2.2 Principales problemas fitosanitarios del banano.....	25
2.3 El nematodo barrenador del banano, <i>Radopholus similis</i> (Cobb) Thorne.....	27
2.4 Manejo Integrado de <i>Radopholus similis</i>	32
2.4.1 Actividades para la exclusión.....	33

2.4.2	Control Químico.	35
2.5	Uso de microorganismos en el combate de nematodos.	39
2.5.1	Control biológico de nematodos.	41
2.5.2	Mejoramiento biológico de plantas con microorganismos endofíticos provenientes de suelos supresivos.	51
2.5.3	Enmiendas orgánicas y otras alternativas.	58
3.	METODOLOGÍA.	62
3.1	Tipo de Investigación.	63
3.2	Método de investigación.	63
3.3	Ubicación espacial y temporal.	64
3.4	Instrumentos utilizados para la ejecución del proyecto.	65
3.5	Procedimiento.	66
3.5.1	Muestreo y caracterización del área supresiva.	66
3.5.2	Procesamiento de las muestras y obtención de los aislamientos bacterianos.	69
3.5.3	Caracterización de los aislamientos y selección de candidatos.	71
3.5.4	Identificación molecular de los aislamientos seleccionados.	75
3.5.5	Experimentación en vivero con plantas de banano.	76
3.5.6	Diseño experimental y variables a evaluar.	84
3.5.7	Análisis de los datos.	87
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	88
4.1	Caracterización nematológica, química y microbiológica del suelo en el área supresiva muestreada.	89
4.2	Aislamientos obtenidos según tipo de muestra.	93
4.3	Caracterización de los aislamientos y selección de los candidatos.	95
4.4	Identificación Molecular.	108
4.5	Experimento de vivero.	113
4.5.1	Estudio comparativo de las características químicas y microbiológicas del suelo supresivo y el suelo de siembra, previo y al final del experimento.	113
4.5.2	Producción de inóculo y estandarización de la concentración.	117
4.5.3	Efecto de los tratamientos sobre las variables de crecimiento.	120
4.5.4	Efecto de los tratamientos sobre la reproducción de los nematodos.	127

4.5.5	Efecto de los tratamientos agrupados según origen (SER, SR, R), sobre las variables de Crecimiento Vegetativo y Control de Nematodos.	132
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	144
5.1	Conclusiones.....	145
5.2	Recomendaciones.	147
6.	REFERENCIAS.....	149
7.	ANEXOS	170

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Superficie sembrada de banano a nivel mundial en el año 2005. Datos en miles de hectáreas.....	20
Cuadro 2. Producción de banano a nivel mundial en el año 2005.....	21
Cuadro 3. Exportación de banano a nivel mundial en el año 2012.	22
Cuadro 4. Cantones productores de banano y su área de siembra. Año 2012.....	24
Cuadro 5. Características culturales y celulares estudiadas.	73
Cuadro 6. Tratamientos utilizados en el experimento.....	82
Cuadro 7. Cronograma de actividades de mantenimiento del experimento.	84
Cuadro 8. Comparación en cuanto a peso (g) de raíz funcional y raíz no funcional (g) por planta, y número de nematodos por 100g de raíces, entre el área supresiva y el área conduciva.	90
Cuadro 9. Análisis químico y textural del suelo proveniente del área supresiva.	91
Cuadro 10. Cantidades totales (UFC/g de suelo) de hongos, bacterias y actinomicetes presentes en el suelo conducivo y supresivo a nematodos.....	93
Cuadro 11. Número de aislamientos obtenidos según tipo de muestra.	94
Cuadro 12. Número de aislamientos con y sin endósporas visibles, de acuerdo al tipo de muestra y al total coleccionado.	97
Cuadro 13. Número de características culturales y celulares según dendrograma, representatividad (%) y tamaño de los grupos formados.	99
Cuadro 14. Reducción del N° de características y efecto sobre el N° de grupos formados (≥ 4), el total de aislamientos y la representatividad de cada dendrograma generado.	100
Cuadro 15. Estructura del dendrograma N°14 (19 características), en cuanto a número de grupos, aislamientos incluidos y similitud compartida (%).	102
Cuadro 16. Calificación de las características totales y de las características utilizadas para la generación del dendrograma seleccionado (N° 14).	104
Cuadro 17. Tratamientos preseleccionados para el experimento de vivero.	107
Cuadro 18. Número de aislamientos seleccionados para el experimento de vivero y su relación con la distribución porcentual de microorganismos coleccionados de acuerdo a su origen.	108

Cuadro 19. Identificación de las secuencias amplificadas del gen RNA16S mediante PCR, por medio de las bases de datos RDP (The Ribosomal database Project) y NCBI (National Center Biotechnology Information).	111
Cuadro 20. Referencias de especies de <i>Bacillus</i> con efecto sobre nematodos.	113
Cuadro 21. Promedios de pH, materia orgánica, elementos mayores y menores del suelo supresivo (n=2), suelo de siembra (n=3) y suelo al final del experimento, según tipo de tratamiento (SER= suelo extrarizosférico. SR= suelo rizosférico. R=raíz).	114
Cuadro 22. Contenidos foliares promedio de elementos químicos según tratamiento.	115
Cuadro 23. Contenido de hongos, bacterias y actinomicetes totales en el suelo (UFC/g), según tipo de tratamiento.	117
Cuadro 24. Concentración (ufc/g) de cada bacteria según tratamiento, utilizada para inocular vitroplantas de banano.	118
Cuadro 25. Promedio (\pm error estándar) de las variables de crecimiento, según aislamiento bacteriano aplicado.	120
Cuadro 26. Porcentaje de incremento o de reducción de las variables de crecimiento según tratamiento aplicado, respecto al promedio alcanzado por TEST NEMA.	124
Cuadro 27. Aislamientos que clasificaron entre las tres mejores posiciones en cuanto a variables de crecimiento vegetativo.	125
Cuadro 28. Promedio (\pm error estándar) del número de nematodos presente en 100g de raíz, según aislamiento bacteriano aplicado.	128
Cuadro 29. Número inicial de nematodos (previo a inoculación de <i>Radopholus similis</i>) presentes en 250g de suelo de siembra luego de su homogenización.	129
Cuadro 30. Aislamientos que clasificaron entre las tres mejores posiciones en cuanto a la reproducción de los nematodos.	132
Cuadro 31. Promedio (\pm error estándar) de las variables de crecimiento, alcanzado grupalmente de acuerdo al origen de los aislamientos.	133
Cuadro 32. Promedio (\pm error estándar) del Logaritmo Natural de la cantidad de nematodos en 100g de raíz, alcanzado grupalmente de acuerdo al origen de los aislamientos.	133
Cuadro 33. Composición de la población de nematodos inoculados por maceta a los 34 DDS.	141

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Destino de la exportación de banano de Costa Rica en el año 2012.	24
Figura 2. a) Detalle de juvenil, huevo y adulto de <i>R. similis</i> ; b) daño a la raíz; c) volcamiento de plantas.	30
Figura 3. Ciclo de daño de <i>Radopholus similis</i>	31
Figura 4. Aplicador de nematicida granulado y aplicación granulada frente al hijo de sucesión.	35
Figura 5. Fotografía satelital mostrando las instalaciones del Centro de Control Biológico y el vivero de la sección de nematología.	65
Figura 6. Instrumentos, materiales y equipos utilizados en la investigación.	66
Figura 7. Ubicación geográfica y condiciones generales de la plantación.	67
Figura 8. Ubicación del punto de muestreo frente al hijo de sucesión (izquierda) y tipos de muestra recolectados (derecha).	68
Figura 9. Distribución y ubicación de los puntos de muestreo.	69
Figura 10. Procedimiento utilizado para la obtención de bacterias a partir de las muestras de suelo (rizosférico y extra rizosférico) y raíz.	71
Figura 11. Vitroplantas del clon Grande Naine en fase IV (izquierda) y unidad experimental (derecha).	77
Figura 12. Producción de inóculo bacteriano y estandarización de la concentración de cada bacteria.	78
Figura 13. Primera inoculación preventiva de bacterias mediante la inmersión del sistema radical.	79
Figura 14. Inoculación de bacterias mediante “drench” (100 ml).	80
Figura 15. Inoculación de nematodos mediante “drench”.	81
Figura 16. Condiciones del vivero y distribución de las unidades experimentales.	84
Figura 17. Diámetro del pseudotallo (izquierda) y altura y número de hojas (derecha).	85
Figura 18. Peso fresco de raíz - cormo y de follaje y pseudotallo.	86

Figura 19. Células bacilares (en forma de “bastón”) y endósporas típicas del género <i>Bacillus</i> sp (aislamiento SER-35).	97
Figura 20. Efecto reductivo del número de características culturales y celulares, en la representatividad (%) de los dendrogramas y el incremento en el número promedio de aislamientos incluidos en cada grupo formado.	99
Figura 21. Efecto de la disminución del número de características, sobre el número de grupos formados (≥ 4), el número promedio de aislamientos incluido por grupo y la representatividad (%) dentro del total de microorganismos caracterizado.....	101
Figura 22. Dendrograma generado por Treecom para 19 características. Las flechas rojas señalan los 20 grupos formados por 4 ó más microorganismos, compartiendo como mínimo el 79% de sus características.....	105
Figura 23. Gel de Agarosa 1.5%, mostrando la amplificación los iniciadores específicos Bac F y Bac R (a), y generales para bacterias (b y c) (Kuske, <i>et al.</i> 1998).....	109
Figura 24. Análisis de agrupamiento UPGMA, MEGA 5.10.	112
Figura 25. Peso fresco de raíz (\pm error estándar) según tratamiento aplicado. Los aislamientos SER-217, SER-23 y SR-05 presentaron diferencias estadísticas respecto a TESTNEMA ($Pr < 0,05$), según prueba de Dunnett.....	121
Figura 26. Peso fresco de follaje (\pm error estándar) según tratamiento aplicado. No se presentaron diferencias estadísticas entre tratamientos.....	121
Figura 27. Peso seco de follaje (\pm error estándar) según tratamiento aplicado. No se presentaron diferencias estadísticas entre tratamientos.....	122
Figura 28. Altura de la planta (\pm error estándar) según tratamiento aplicado. No se presentaron diferencias estadísticas entre tratamientos.....	122
Figura 29. Número de hojas (\pm error estándar) según tratamiento aplicado. No se presentaron diferencias estadísticas entre tratamientos.....	123
Figura 30. Diámetro del pseudotallo (\pm error estándar) según tratamiento aplicado. No se presentaron diferencias estadísticas entre tratamientos.....	123
Figura 31. Logaritmo Natural del número de nematodos totales (\pm error estándar) en 100g de raíz, según tratamiento aplicado. El testigo químico mostró diferencias estadísticas respecto a TESTNEMA, según prueba de Dunnett ($P=0,0180$).	129
Figura 32. Número de <i>Radopholus similis</i> en 100g de raíz (\pm error estándar), según tratamiento aplicado. Se presentaron diferencias estadísticas respecto a TESTNEMA, para el testigo químico ($P=0,0111$).	130

Figura 33. Número de <i>Helicotylenchus sp</i> en 100g de raíz (\pm error estándar), según tratamiento aplicado. No se presentaron diferencias estadísticas entre tratamientos (P=0,9330).....	130
Figura 34. Cantidad de <i>Meloidogyne sp</i> en 100g de raíz (\pm error estándar), según tratamiento aplicado. No se presentaron diferencias estadísticas respecto a TESTNEMA (P=0,9998).....	131
Figura 35. Cantidad de <i>Pratylenchus sp</i> en 100g de raíz (\pm error estándar), según tratamiento aplicado. No se presentaron diferencias estadísticas respecto a TESTNEMA (P=0,9998).....	131
Figura 36. Reproducción de nematodos totales en plantas sin la aplicación artificial de <i>Radopholus similis</i> , en comparación con la densidad final presente en el testigo inoculado (TESTNEMA) y en el testigo químico.....	142
Figura 37. Reproducción de <i>Radopholus similis</i> en plantas sin su aplicación artificial, en comparación con la densidad final presente en el testigo inoculado (TESTNEMA) y en el testigo químico.....	142

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. Variables climatológicas durante el periodo experimental.....	171
ANEXO 2. Protocolo para el recuento de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) de hongos, bacterias y actinomicetes totales (Recuento de Viabiles).	177
ANEXO 3. Técnica de Conservación de bacterias esporulantes mediante crioconservación y papel filtro.....	179
ANEXO 4. Tinciones bacterianas.	181
ANEXO 5. Ficha utilizada para la caracterización morfológica de los aislamientos.....	184
ANEXO 6. Patrón de Turbidez 0,5 Escala de Mc Farland.....	185

LISTA DE ABREVIATURAS

ACB: Agente de control biológico.

ADE: Agua destilada estéril.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AN: Agar nutritivo

ARN: Ácido ribonucleico.

CORBANA: Corporación Bananera Nacional.

DDS: Días después de la siembra.

FAO: Food and Agriculture Organization (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura).

FD: Factor de dilución.

IICA: Instituto Interamericano de Cooperación Agrícola.

LN: Logaritmo natural.

n: Número de muestras.

NCBI: National Center of Biotechnology Information.

msnm: Metros sobre el nivel del mar.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés).

PROCOMER: Promotora del Comercio Exterior de Costa Rica.

RDP: The Ribosomal Database Project.

RF: Raíz funcional.

RNF: Raíz no funcional.

SER: suelo extrarizosférico.

SM: suspensión madre.

SR: suelo rizosférico.

SSE: solución salina estéril

TEST NEMA: testigo inoculado con nematodos pero sin aplicación de agentes de control.

UFC: unidad formadora de colonia.

UFC/g: unidades formadoras de colonia por gramo de muestra sólida.

UFC/ml: unidades formadoras de colonia por gramo de muestra líquida.

UP: unidad de producción.

UPGMA: Unweighted-Pair Group Method with Arithmetic Means

Vol (ml): volumen expresado en mililitros.

v/v: concentración porcentual expresada en volumen de soluto entre volumen total.

\bar{X}_{ufc} : promedio de unidades formadoras de colonia.

μL: microlitro.

RESUMEN

El uso de nematicidas en el cultivo de banano es una práctica extendida dentro del manejo integrado de *Radopholus similis* y otros nematodos fitoparásitos; sin embargo, debido a la alta toxicidad de estos productos, es necesario hacer un uso muy restringido y seguir protocolos de aplicación eficaces para evitar efectos sobre el ambiente y las personas que los aplican. Como una alternativa, se ha demostrado a nivel experimental, que diferentes tipos de microorganismos tienen el potencial de inhibir la infección de los nematodos a la raíz y a la vez, promover el crecimiento vegetativo de la planta. Asimismo, se ha planteado que el éxito en el desarrollo de estos productos, podría incrementarse utilizando microorganismos extraídos de suelos supresivos a nematodos. El presente estudio tuvo como objetivo la evaluación de bacterias esporulantes relacionadas al género *Bacillus*, aisladas de un suelo supresivo a *R. similis*, sobre el crecimiento de vitroplantas de banano y la reproducción de *R. similis* y otros nematodos asociados a la raíz, bajo condiciones de vivero. La prospección y aislamiento se realizó en una sección de suelo caracterizado como supresivo a *R. similis*, ubicado en una finca bananera del cantón de Guácimo, Costa Rica. Luego del levantamiento de la colección, los 323 aislamientos obtenidos, fueron caracterizados morfológicamente y la información fue analizada mediante el programa TREECON[®]. Esto permitió la identificación de 20 grupos morfológicos que representaron el 77,1% del total de aislamientos de la colección. Un representante de la mayoría de los grupos formados fue evaluado bajo condiciones de vivero utilizando vitroplantas de banano del cultivar Grande Naine en fase VI, las cuales se sembraron en macetas de 1,8 litros de capacidad con suelo bananero no esterilizado. En el experimento se incluyó un testigo químico (Vydate[®]), un testigo absoluto y un testigo inoculado con nematodos, pero sin aplicación de agentes de control (TESTNEMA). Se realizó una primera inoculación de las bacterias al trasplante, mediante inmersión del sistema radical por 5 minutos y 15 días después de la siembra (DDS), se realizó una segunda inoculación aplicando en forma de “drench”, 100ml de la suspensión bacteriana a cada planta. Al día 34 DDS se

inoculó un promedio de 506 *R. similis* por maceta y posteriormente se realizaron dos nuevas inoculaciones de las bacterias a los 49 y 63 DDS. La concentración de las bacterias se ajustó mediante la equiparación con la turbidez del patrón 0,5 de la escala de Mc Farland. El rango de concentración se estableció entre $1,2 \times 10^7$ y $5,4 \times 10^8$ UFC/ml. El experimento se cosechó a los 77 DDS. Se encontraron diferencias estadísticas para la variable Peso Fresco de Raíz ($P=0,0025$), siendo los tratamientos SER-217 ($28,6 \pm 2,7g$), SER-23 ($23,3 \pm 2,2g$) y SR-05 ($22,9 \pm 1,9 g$) los que promovieron significativamente el crecimiento, respecto a TESTNEMA ($15 \pm 1,7$). Por otra parte, únicamente el tratamiento con Vydate® logró reducir la densidad de nematodos totales ($P=0,0180$) y de *R. similis* ($P=0,0111$) de forma significativa, respecto a TESTNEMA. Al agrupar y analizar los resultados de acuerdo al origen de los aislamientos (suelo extra rizosférico, suelo rizosférico y raíz), no se observaron diferencias significativas en crecimiento, ni en la densidad de los nematodos, con respecto a TESTNEMA. Se discute el posible efecto de factores bióticos (competencia entre microorganismos, tipo de cultivo bacteriano) y abióticos (textura, pH materia orgánica y contenido de elementos químicos del suelo), que pudieron haber incidido en los resultados obtenidos.

Palabras clave: control biológico, banano (*Musa AAA*), suelo supresivo, nematodos, *Radopholus similis*, promoción de crecimiento vegetal, *Bacillus*.

1.INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción al tema.

El control biológico se define como “*el uso de un organismo para reducir la densidad poblacional de otro*”; es también la manera más efectiva y ambientalmente segura para el manejo de las plagas y es la forma que ha desarrollado la naturaleza para mantener a los organismos perjudiciales en niveles bajos. El control biológico está presente en todos los ecosistemas naturales y modificados por el hombre y siempre está activo (van Lenteren 2006).

Aunque el manejo de los nematodos parasíticos de plantas (fitonematodos) ha sido a través del uso de nematicidas, de la resistencia del posible hospedante y de la rotación de cultivos, en los últimos 20 años, se han producido avances importantes con el uso de diferentes grupos de microorganismos.

No obstante, esta herramienta biológica actualmente es poco utilizada y se restringe a unos cuantos productos comerciales, dentro de los cuales el hongo *Paecilomyces lilacinus* es el más importante componente (Timper 2011).

Esta situación podría revertirse fundamentando los proyectos de investigación y de selección de candidatos con potencial de regulación, en colecciones de microorganismos nativos amplias y diversas, así como en la implementación de protocolos de selección eficaces que logren visualizar el potencial global de cada microorganismo, dado que mucho material valioso puede estar siendo descartado porque aunque teniendo diferentes propiedades y atributos, únicamente se le evalúa uno de ellos. Se ha establecido que por cada 100 candidatos que se evalúan, únicamente uno de ellos (1%) tendrá los atributos suficientes como para generar un producto biológico a escala comercial (Köhl et al. 2011).

Para incrementar la probabilidad de obtener buenos resultados en la investigación y el desarrollo de ACB, es importante utilizar sitios en donde

naturalmente el tipo de supresión que se busca, sea conspicua y esté bien documentada.

Para el caso de los nematodos, está ampliamente documentada y comprobada la existencia de suelos supresivos, en los cuales la infección declina con el tiempo o se ve reducida aun estando presente el patógeno y existan hospedantes susceptibles (Westphal 2005, Timper 2011).

Para el caso de los nematodos que afectan al banano y en particular de *Radopholus similis*, se ha demostrado en experimentos a nivel de vivero, que la infección de las raíces con algunos hongos y bacterias aislados de la raíz de plantas de banano presentes en un suelo supresivo a nematodos, muestran un efecto positivo reduciendo la infección y la proliferación de los nematodos en las raíces, el daño a las plantas e incrementando el crecimiento vegetativo, respecto a plantas no inoculadas. A esto se le ha llamado “supresividad in-planta” (in-plant suppressiveness) mediante “bioendurecimiento” (biological enhancement) (Sikora et al. 2010).

Se piensa que si los suelos agrícolas contienen sus propios microorganismos capaces de reducir las poblaciones de fitonematodos, su aprovechamiento podría ir en función de su conservación y de su incremento mediante la manipulación de su hábitat. Otra alternativa podría ir enfocada hacia su escalamiento y aplicación masiva (Timper 2011). A la vez, se piensa que utilizar microorganismos aislados de suelos supresivos, podría ser un factor que aporte mayores probabilidades de éxito en el desarrollo de un producto biológico para el combate de nematodos (Siddiqui y Mahmood 1999).

Por ser más fáciles de producir masivamente y por el gran potencial que como Agentes de Control Biológico (ACB) de fitonematodos se les ha identificado, las bacterias podrían tener ventajas sobre otros microorganismos. Dentro de las bacterias, el género *Bacillus* ha sido por más de 90 años el principal ACB de plagas y son varias las especies que han mostrado actividad regulatoria hacia

nematodos (*B. thuringiensis*, *B. firmus*, *B. subtilis*, *B. nematocida*, *B. cereus*, *B. pumilus* y *B. lincheniformis*).

El objetivo de esta investigación es estudiar a nivel de vivero, el efecto de la aplicación de bacterias asociadas al género *Bacillus*, aisladas de un suelo supresivo, sobre el crecimiento de plantas de banano y la densidad radical de *Radopholus similis* y otros nematodos.

1.2 Justificación.

Barker y Koenning (1998) establecen que a nivel mundial, las pérdidas por el efecto de los nematodos en los cultivos agrícolas rondan entre el 5 y el 12% anual. Por su parte, Chitwood (2003), indica que las pérdidas económicas a nivel mundial por el efecto de estos organismos alcanzaron los US\$125 000 millones en el año 2003.

El banano y el plátano no escapan al efecto perjudicial de los nematodos, principalmente del nematodo barrenador, *Radopholus similis* que es considerado como una de las mayores limitantes para la producción de estas musáceas en Costa Rica y el mundo (Araya, 2003).

Radopholus similis es un endoparásito migratorio que coloniza la raíz del banano. Mediante la inserción de su estilete, el nematodo infecta y coloniza raíces sanas de la planta. Al alimentarse con los fluidos citoplasmáticos de las células del parénquima cortical, va produciendo galerías y el necrosamiento gradual de los tejidos, lo que afecta la capacidad de la planta de absorber agua y nutrientes. En casos severos la planta puede perder su capacidad de anclaje y volcarse. El daño se traduce en un menor peso del racimo, en el alargamiento del ciclo productivo, en la reducción de la longevidad de las unidades de producción (UP) y finalmente, en una menor productividad de cajas de banano por área (Sarah et al. 1996, Martinuz et al. 2011). Se estima que las pérdidas

provocadas por *R. similis* pueden incluso alcanzar el 100% si no se le controla eficazmente (Araya 2004).

Este organismo cumple todo su ciclo de vida dentro de la planta y solo migra para colonizar raíces nuevas. Esta característica y la alta susceptibilidad de las variedades comerciales actuales, justifica que los productores recurran a la aplicación de nematicidas, que son sustancias altamente tóxicas y que tienen el potencial para contaminar el ambiente y afectar la biodiversidad. Se ha demostrado que el uso de nematicidas resulta en incrementos significativos en la producción (Araya 2004, Volcy 2011).

Se vislumbra en el corto y mediano plazo, como ha sucedido en el pasado, que algunas de las moléculas de mayor toxicidad que actualmente se utilizan, sean prohibidas para uso en el cultivo, principalmente debido a presiones de los mercados internacionales y de grupos ambientalistas.

Otro factor en contra de los nematicidas, es la significativa pérdida de eficacia de algunos de ellos, como resultado de procesos de “biodegradación aumentada” por microorganismos, sobre todo cuando son aplicados de forma repetitiva (Araya 2003).

Es prioritario por tanto, el desarrollo de alternativas de combate más amigables con el ambiente, pero a la vez eficaces para regular las poblaciones de los nematodos. Dentro de estas, el uso de Agentes de Control Biológico (ACB), mediante hongos y bacterias, ofrece un gran potencial muchas veces inexplorado.

1.3 Objetivo General.

Evaluar la promoción de crecimiento vegetal en vitroplantas de banano (*Musa AAA*) y la actividad antagónica de aislamientos de la bacteria *Bacillus* spp obtenidos de un suelo supresivo, sobre el nematodo barrenador, *Radopholus similis*, bajo condiciones de vivero.

1.4 Objetivos Específicos.

- Implementar un protocolo para aislar y conservar bacterias esporuladas a partir de muestras de suelo rizosférico, extra rizosférico y de raíz de banano, provenientes de un suelo caracterizado como supresivo a nematodos.
- Diseñar un sistema para agrupar a los aislamientos obtenidos de acuerdo a sus características culturales y celulares, seleccionar 20 candidatos representativos del total de microorganismos coleccionados e identificarlos mediante técnicas moleculares.
- Determinar bajo condiciones de vivero, el efecto de la aplicación de los aislamientos seleccionados, sobre el crecimiento vegetativo de plantas de banano y sobre la densidad radical de los nematodos.

1.5 Hipótesis.

H₀: Bajo condiciones de vivero, la aplicación de las bacterias no promueve un mayor crecimiento vegetativo de plantas de banano de la variedad Grande Naine, ni disminuye la densidad de los nematodos en la raíz, respecto al tratamiento con inoculación artificial de *R. similis* y sin aplicación de agentes de control (en adelante denominado TESTNEMA).

H_A: Bajo condiciones de vivero, la aplicación de las bacterias promueve un mayor crecimiento vegetativo de plantas de banano de la variedad Grande Naine, y disminuye la densidad de los nematodos en la raíz, respecto al tratamiento con inoculación artificial de *R. similis* y sin aplicación de agentes de control (en adelante denominado TESTNEMA).

1.6 Definición de términos.

Actinobacterias: Bacterias Gram positivas que pueden formar filamentos ramificados, con una semejanza superficial a algunos hongos filamentosos. Incluyen varios de los organismos del orden de los Actinomycetales (UNAM (s.f.). Recuperado el 22 de abril de 2014, en <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/glosario.html>).

Agente de control biológico: Ente vivo con propiedades para regular la población de otro (s).

Aislamiento: Microorganismo obtenido de una muestra ambiental.

Antagonista: Agente que mediante diferentes mecanismos, inhibe el crecimiento, desarrollo o la reproducción de otro (s), pudiendo causarle la muerte.

Bacteria simbiote: Bacteria que vive en el interior de otro organismo, manteniendo una relación simbiótica con éste.

Barbecho: Período de tiempo no definido en el cual el suelo está desprovisto de un determinado cultivo, pudiendo: estar desprovisto de vegetación, estar sembrado deliberadamente de una cobertura en particular, o estar cubierto por una sucesión natural de plantas. El barbecho tiene el objetivo de recuperar el contenido nutricional del suelo y romper el ciclo biológico de agentes patológicos y de plagas que pueden afectar al cultivo.

Biodegradación: Proceso de descomposición de una sustancia mediante la acción de organismos vivos (DRAE (s.f.)). Recuperado el 22 de abril de 2014, en <http://lema.rae.es/drae/>.

Cadena trófica: Estructura de alimentación (generalmente no lineal) de un grupo de organismos, cada uno de los cuales come o degrada al precedente (Reyes-Matamoros (s.f.)). Recuperado el 22 de abril de 2014, en http://148.228.97.152/jenaroreyes/libros/Libro_4.pdf.

Clon: Conjunto de células u organismos genéticamente idénticos, originado por reproducción asexual a partir de una única célula u organismo o por división artificial de estados embrionarios iniciales (DRAE (s.f.)). Recuperado el 22 de abril de 2014, en <http://lema.rae.es/drae/>.

Colagenasa: Enzima que hidroliza colágeno.

Cultivar: Planta derivada de una variedad cultivada que se ha generado y ha persistido como cultivo. No necesariamente se refiere a una especie botánica, sin embargo, por tener importancia hortícola y botánica, le es asignado un nombre. Taxonómicamente es la designación agronómica de una variedad (se abrevia "cv") (Reyes-Matamoros (s.f.)). Recuperado el 22 de abril de 2014, en http://148.228.97.152/jenaroreyes/libros/Libro_4.pdf.

Cutícula: Cubierta externa de nematodos y artrópodos. Presenta 3 capas, diferentes en los dos grupos (UNAM (s.f.)). Recuperado el 22 de abril de 2014, en <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/glosario.html>.

Endofítico (a): Organismo que crece en el interior de otro.

Endomicorrización: Infección interna de la raíz de las plantas mediante hongos.

Endoparásito: Parásito que penetra en el hospedero y se nutre en su interior (Reyes-Matamoros (s.f.). Recuperado el 22 de abril de 2014, en http://148.228.97.152/jenaroreyes/libros/Libro_4.pdf).

Endóspora: Células diferenciadas formadas dentro de ciertas bacterias Gram positivas; son formas de resistencia. Ej: *Clostridium*, *Bacillus* (UNAM (s.f.). Recuperado el 22 de abril de 2014, en <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/glosario.html>).

Enmienda orgánica: Adición de un sustrato orgánico al suelo con el propósito de mejorar sus condiciones físicas, químicas y microbiológicas.

Enzima lítica: Enzima que provoca la lisis o desdoblamiento de otras sustancias.

Enzima quitinolítica: Enzima que hidroliza quitina.

Enzima proteolítica: Enzima que hidroliza proteínas.

Epifítico (a): Que existe sobre la superficie de una planta u órgano de ésta sin que ocasione infección (Reyes-Matamoros (s.f.). Recuperado el 22 de abril de 2014, en http://148.228.97.152/jenaroreyes/libros/Libro_4.pdf).

Espora: Una espora es una célula reproductora producida por ciertos hongos, plantas (musgos, helechos) y algunas bacterias. Algunas bacterias las producen como mecanismo de defensa ante la presencia de condiciones adversas. Las esporas bacterianas tienen paredes gruesas y pueden resistir las altas temperaturas y la humedad.

Esporulante (esporulado): Que produce esporas.

Endorriza: Parte interna de la raíz de las plantas.

Estilete: Estructura larga, delgada y hueca de los nematodos y algunos insectos, que tiene función alimenticia (Reyes-Matamoros (s.f.). Recuperado el 22 de abril de 2014, en http://148.228.97.152/jenaroreyes/libros/Libro_4.pdf).

Exoesqueleto: Esqueleto externo de los insectos.

Exotoxinas: Toxinas liberadas al exterior de las células de los microorganismos que las producen.

Extracelular: Externo a la célula.

Extrarizosférico (a): Externo(a) a la rizósfera.

Filtrado crudo: Fracción líquida de un cultivo microbiano obtenido mediante filtración, conteniendo metabolitos secundarios y sustancias extracelulares, pero desprovisto de propágulos viables del organismo que los produce.

Fitohormona: Hormona producida por las plantas o por organismos que se asocian a éstas, la cual tiene un efecto fisiológico en las diferentes etapas de su ciclo de vida.

Fitonemátodo: Nematodo parásito de las plantas.

Fitoparásito: Organismo que vive a expensas de una planta.

Fungicida protectante: Sustancia química con efecto contra hongos patógenos, la cual no se absorbe ni transloca por la planta y por lo tanto, tiene su efecto en el sitio en donde se aplica.

Fungicida sistémico: Sustancia química con efecto contra hongos patógenos, la cual se absorbe y transloca en el interior de la planta y por lo tanto, tiene efecto en otros sitios diferentes de donde se aplica.

Hongo micorrízico-arbuscular: Tipo de micorriza (hongo que infecta las raíces de las plantas y establece una relación simbiótica con éstas) que desarrolla estructuras en forma de árbol.

Inocular: Aplicación de uno o varios microorganismo(s), o propágulos de estos, en un sitio definido.

Lumen: Espacio interior de una estructura tubular; en el caso de los nematodos, es el espacio interior del estilete.

Mejoramiento biológico: Acción deliberada en la cual una planta es infectada por microorganismos benéficos que le brindan protección ante el efecto de patógenos y plagas.

Metabolitos secundarios: Compuestos orgánicos sintetizados por el organismo que no tienen un rol directo en el crecimiento o reproducción del mismo. A diferencia de lo que sucede con los metabolitos primarios, la ausencia de algún metabolito secundario no le impide la supervivencia, si bien se verá afectado por ella, a veces gravemente.

Micorrización: Infección artificial o natural de las raíces de las plantas con micorrizas.

Mutualismo: Relación simbiótica entre especies en la que todas se benefician en una comunidad ecológica (Reyes-Matamoros (s.f.). Recuperado el 22 de abril de 2014, en http://148.228.97.152/jenaroreyes/libros/Libro_4.pdf).

Necrosis: Áreas parciales o totales de tejidos muertos por acción de fitopatógenos, daños meteorológicos, insuficiencia de nutrientes, etc. (Reyes-Matamoros (s.f.). Recuperado el 22 de abril de 2014, en http://148.228.97.152/jenaroreyes/libros/Libro_4.pdf).

Nematicida: Compuesto químico o agente físico que destruye o inhibe nematodos (Reyes-Matamoros (s.f.). Recuperado el 22 de abril de 2014, en http://148.228.97.152/jenaroreyes/libros/Libro_4.pdf).

Nematófago (a): Organismo que se alimenta de los nematodos.

Nematosis: Infección y afección producida por nematodos.

Nematóxico: Agente de origen sintético o natural sintético con efecto tóxico a los nematodos.

Parásito (a): Perteneciente o relativo a los parásitos (DRAE (s.f.). Recuperado el 22 de abril de 2014, en <http://lema.rae.es/drae/>).

Parásito: Dicho de un organismo animal o vegetal: Que vive a costa de otro de distinta especie, alimentándose de él y debilitándolo sin llegar a matarlo (DRAE (s.f.). Recuperado el 22 de abril de 2014, en <http://lema.rae.es/drae/>).

Parásito oportunista: Organismo que bajo ciertas condiciones, puede actuar como parásito.

Patozona: Área cónica que rodea a la raíz desde sus primeras etapas de crecimiento y que cubre un espacio de entre 25 y 50 cm en todas direcciones, partiendo de la base de la planta (Sikora y Pocasangre 2006).

Proteasa: Grupo de enzimas responsables de la hidrólisis de enlaces peptídicos presentes en las proteínas.

Proteína Cry: Proteína que es codificada por un gen específico de *Bacillus thuringiensis* y que produce toxinas que afectan a insectos y nematodos

Pseudotallo: Tallo falso de las musáceas constituido por envolturas de vainas foliares.

Quitinasa: Enzima que degrada la quitina.

Ratio: Número de cajas de 18,14 kg que se produce en promedio por racimo.

Retorno: número promedio de racimos producidos anualmente por una unidad de producción.

Rizobacterias: bacterias que colonizan la rizósfera. Algunas de ellas establecen relaciones simbióticas con las plantas.

Rizoma: tallo horizontal que crece, parcial o completamente bajo el suelo, y que produce brotes aéreos y raíces en sus nudos. A menudo se ensanchan y sirven como órganos de almacenamiento. También se denomina así a la parte inferior de un injerto (Reyes-Matamoros (s.f.). Recuperado el 22 de abril de 2014, en http://148.228.97.152/jenaroreyes/libros/Libro_4.pdf).

Rizósfera: suelo que se encuentra próximo a una raíz viva (Reyes-Matamoros (s.f.). Recuperado el 22 de abril de 2014, en http://148.228.97.152/jenaroreyes/libros/Libro_4.pdf).

Rizosférico (a): perteneciente o ubicado en la rizósfera.

Saprófito: organismo que obtiene sus nutrientes de materia orgánica en descomposición (Reyes-Matamoros (s.f.). Recuperado el 22 de abril de 2014, en http://148.228.97.152/jenaroreyes/libros/Libro_4.pdf).

Suelo conductor: suelo cuyo componente biótico permite la infección de los nematodos en un hospedante susceptible, expresando éste síntomas de la afección.

Suelo supresivo: suelo cuyo componente biótico no permite la infección de los nematodos en un hospedante susceptible; la permite pero es muy baja y el hospedante no muestra síntomas; o la permite y el hospedante muestra síntomas, pero por un espacio de tiempo limitado (Westphal 2005).

Supresividad: condición de limitar la infección de un organismo y el desarrollo de una enfermedad, en presencia de un patógeno y de un hospedante susceptible.

Termoestable: sustancia que mantiene su composición y propiedades a temperaturas elevadas

Unidad de producción: conjunto constituido por la planta madre y el hijo de sucesión.

Vitroplantas: plantas provenientes de cultivo de tejidos.

1.7 Definición de variables.

- **SIMILITUD (%):** Porcentaje que representa el número de características morfológicas que comparten dos o más aislamientos, respecto al total de características estudiadas.

$$\text{SIMILITUD (\%)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de características compartidas}}{\text{Total de características estudiadas}} \times 100$$

- **REPRESENTATIVIDAD DEL DENDROGRAMA (%):** Porcentaje que representa la sumatoria del número de aislamientos formando grupos de 3, 4 o 5 aislamientos, que comparten al menos el 50% de sus características de un determinado dendrograma, respecto al total de aislamientos caracterizados.

$$\text{REPRESENTATIVIDAD (\%)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ total de aislamientos agrupados}}{\text{Total de aislamientos caracterizados}} \times 100$$

- **N° DE HOJAS:** Cantidad de hojas sanas y totalmente desenvueltas, presentes al finalizar el experimento.
- **ALTURA DE LA PLANTA:** Medida (cm) que va desde la superficie del suelo, hasta la axila de la hoja más joven totalmente desenvuelta, al finalizar el experimento.
- **DIÁMETRO DEL PSEUDOTALLO:** Medida (cm) de la periferia del pseudotallo en la base de la planta, al finalizar el experimento.
- **PESO FRESCO DE RAÍZ:** Sumatoria del peso (g) del cormo y de la raíz de la planta al finalizar el experimento.
- **PESO FRESCO DEL PSEUDOTALLO:** Peso (g) de la parte aérea de la planta (pseudotallo y hojas) al finalizar el experimento.
- **PESO SECO DEL PSEUDOTALLO:** Peso (g) de la parte aérea de la planta (pseudotallo y hojas), luego de someterse a un proceso de secado.
- **NEMATODOS TOTALES:** Sumatoria de todos los nematodos presente en 100g de raíz.
- **NEMATODOS SEGÚN ESPECIE:** Cantidad de nematodos según especie, presentes en 100g de raíz.

1.8 Delimitaciones.

La investigación se limitó a dos aspectos: a) el establecimiento, la caracterización y el agrupamiento por similitud morfológica, de un grupo de microorganismos provenientes de un suelo supresivo a *Radopholus similis*. Esto se realizó con la finalidad de asegurar que los aislamientos estuviesen relacionados al género de interés (*Bacillus*), y a la vez, con el objetivo de desarrollar un sistema objetivo y práctico para seleccionar aislamientos de acuerdo a las características de interés previamente definidas; b) la evaluación del potencial de los aislamientos seleccionados, como agentes de control de *Radopholus similis* (y en general, de los nematodos que atacan al banano), y como agentes promotores del crecimiento vegetal, utilizando para ello plantas de banano del subgrupo Cavendish cv. Grande Naine, provenientes de cultivo de tejido (vitroplantas), sometidas a condiciones de vivero.

1.9 Limitaciones.

La implementación de programas de selección a nivel de vivero de agentes de control de plagas, de naturaleza química o biológica, es una herramienta muy demandante de recursos económicos, tiempo y de espacio físico. Por esta razón lo más recomendable, es primero implementar bioensayos *in vitro* que permitan hacer una rápida evaluación del potencial de los agentes que se deseen evaluar; y segundo, utilizar para estudios posteriores a nivel de vivero, únicamente a los que hayan mostrado las condiciones más deseables. Esta alternativa no pudo implementarse en este estudio debido a una prácticamente nula patogenicidad *in vitro* de los aislamientos preliminarmente evaluados, lo cual entre otros factores, pudo deberse al sistema de producción empleado, a la dosificación del microorganismo y al tiempo y condiciones de incubación. En ensayos preliminares *in vitro* se presentó además contaminación con bacterias,

lo que dificultó la evaluación y pudo haber afectado el desempeño de los microorganismos que se evaluaron.

Las condiciones que necesita un determinado microorganismo para establecerse y colonizar un nicho ecológico, son muy específicas y dependen de múltiples factores (bióticos y abióticos), por lo que su potencial biológico podría únicamente expresarse al máximo, al ser aplicado en el mismo lugar del cual fue aislado. Por razones de logística y de políticas de la empresa dueña de la finca, en el experimento no se utilizó el mismo suelo del cual fueron obtenidos los aislamientos, lo cual pudo haber jugado un papel importante en el resultado del mismo.

No se cuenta con una metodología eficaz para eliminar a los nematodos residentes en el suelo, sin alterar la microflora y los contenidos de elementos químicos y otras sustancias presentes. Si se utiliza suelo esterilizado, se elimina tanto a los nematodos, como gran parte de la microflora residente, dando como resultado un efecto más acentuado del microorganismo que se inocule y evalúe. Por otra parte, si no se esteriliza el suelo, se asegura una situación más real de competencia entre los microorganismos residentes y el que se inocula, pero no asegura una población inicial de nematodos homogénea, tal como sucedió en este experimento. Para eliminar este sesgo experimental, es necesario incrementar sustancialmente el número de repeticiones de cada tratamiento, lo cual va a derivar en mayores costos de mantenimiento y de evaluación del experimento, así como en mayores necesidades de infraestructura y logística en general.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Importancia socio-económica del banano.

El banano y el plátano (*Musa* sp) son dos cultivos gran importancia socio-económica. A nivel mundial, la producción anual de estas dos musáceas alcanza las 97 millones de toneladas métricas (TM) y representa una fuente muy importante de divisas, una forma de vida y una fuente de empleo para millones de personas (Tripathi 2003; Honfo, et al. 2012).

En países africanos su consumo aporta hasta el 25% de la necesidad diaria de carbohidratos y son una rica fuente de vitamina A, B₆, C, minerales y fibra, para un aproximado de 70 millones de habitantes en ese continente. El 60% de la producción de banano y plátano es producida y consumida en África Oeste y Central, y representa en promedio 200 calorías o más al día, para los habitantes de esa región (Tanimola et al. 2013).

Según los datos de la FAO (IICA 2007), para el año 2005, en el mundo se sembraron unas 4 040 800 hectáreas de banano, siendo Brasil (12,15%), Filipinas (10,33%) y la India (10,02%), los países que mayor área de siembra poseen, acumulando el 30% de la superficie mundial. Otros países con extensas áreas de siembra son Indonesia, Burundi, China y Ecuador, quienes poseen el 7,79, 7,50, 6,78 y 5,47% del área total de siembra de esta fruta. El cuadro 1 muestra los 10 países con mayor área de producción en el año 2005.

Cuadro 1. Superficie sembrada de banano a nivel mundial en el año 2005. Datos en miles de hectáreas.

PAÍS	Miles de has.	%
Brasil	491,18	12,15
Filipinas	417,80	10,33
India	404,20	10,02
Indonesia	315,0	7,80
Burundi	303,42	7,51
China	274,2	6,79
Ecuador	221,09	5,47
Tailandia	140,94	3,49
Uganda	138,23	3,42
Vietnam	93,90	2,32
Total Mundial	4 040,80	100,00

Fuente: FAOSTAT (adaptado de IICA 2007).

En lo que a producción se refiere, según FAO, la India ocupó en el año 2005 el primer lugar con un volumen total de 11 710 300 TM, lo cual representó el 17,44% de la producción mundial de ese año. En orden descendente le siguieron Brasil, China, Filipinas y Ecuador, cuyos volúmenes de producción oscilaron entre los 6 y 7 millones de TM. En ese año Costa Rica se ubicó en el séptimo lugar con una producción de 2 352,62 TM (IICA 2007). El cuadro 2 muestra los 10 países de mayor producción de la fruta para el año 2005, los cuales en conjunto representaron el 75% del total producido en el mundo.

Cuadro 2. Producción de banano a nivel mundial en el año 2005.

PAÍS	Miles de TM	%
India	11 710,30	17,44
China	6 703,40	9,98
Brasil	6 666,72	9,93
Filipinas	6 298,23	9,38
Ecuador	6 118,43	9,11
Indonesia	4 503,47	6,71
Costa Rica	2 352,62	3,50
México	2 250,04	3,35
Tailandia	1 864,85	2,78
Colombia	1 764,50	2,63
Total Mundial	67 139,57	100,00

Fuente: FAOSTAT (adaptado de IICA 2007).

Del total de fruta que se produce, únicamente se exporta el 20%; esto quiere decir que el 80% restante, forma parte de la dieta diaria de millones de personas (IICA 2007). A pesar de solo comercializarse la quinta parte de la producción mundial, el banano es considerado a nivel mundial, como el cuarto cultivo agrícola de exportación más importante y el primero en el caso de las frutas (Brooks 2004).

Para el período 2012, el volumen exportado alcanzó un nuevo record llegando a 16,5 millones de TM, lo cual significó un aumento del 7,3% respecto al año 2011. Dicho incremento fue explicado principalmente por una mayor producción en el área de América Latina y el Caribe, en donde se pasó de 12,5 a 13,0 millones de TM (FAO 2014).

Los mayores países exportadores durante ese año fueron Ecuador (4 982,1 TM), Filipinas (2 646,1 TM), Costa Rica (2 028,6 TM), Guatemala (1 920,8 TM) y Colombia (1 834,9 TM). Porcentualmente estas exportaciones

correspondieron al 30,20; 16,04; 12,30; 11,64 y 11,12%, respectivamente (FAO 2014). El cuadro 3 muestra los 10 países de mayor exportación bananera en el año 2012, los cuales en conjunto representaron el 94,00% del total mundial exportado.

Cuadro 3. Exportación de banano a nivel mundial en el año 2012.

PAÍS	Miles de 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
Honduras	901,4	5,46
Costa de Marfil	339,4	2,06
México	307,5	1,86
República Dominicana	297,2	1,80
Camerún	246,5	1,49
Total Mundial	16 494,8	100,00

Fuente: adaptado de FAO 2014.

En el caso específico de Costa Rica, las siembras de banano iniciaron en 1872 en el Valle de río Zent, provincia de Limón, con semilla importada de Panamá por el señor Minor Keith, quien estaba a cargo de la construcción del ferrocarril al Atlántico y vio al banano como una oportunidad para suplir con fletes al incipiente proyecto ferroviario (Soto 1991).

En Costa Rica el área de siembra de banano alcanzó en el 2012 las 41.426 has., y para ese mismo año exportó 107 millones de cajas de 18,14 kg, con un valor de \$822,7 millones.

Según PROCOMER (2013) durante el año 2012 las exportaciones de banano le permitieron alcanzar al cultivo, el primer lugar dentro de los rubros de producto agrícola y de producto fresco de exportación del país, representando el 32,5 y el 43,2% del total nacional, respectivamente. La exportación bananera fue además en ese año, la segunda más importante actividad exportadora después de los circuitos integrados y las microestructuras electrónicas. Según CORBANA (s.f.). Recuperado el 15 de marzo de 2014, de <http://www.corbana.co.cr/categories/estadisticas-bananeras>, la actividad bananera representó el 7,5% del total de exportaciones nacionales en el año 2012.

El banano se produce principalmente en la vertiente del Caribe, en los cantones de Matina, Pococí, Siquirres, Guácimo, Limón y Talamanca, pertenecientes a la provincia de Limón; así como en el cantón de Sarapiquí, perteneciente a la provincia de Heredia. Existen también áreas de producción en la vertiente del Pacífico, en los cantones de Parrita, Corredores y Osa, pertenecientes a la provincia de Puntarenas. El cuadro 4 muestra las áreas de producción según cantón y su porcentaje respectivo de acuerdo al total nacional.

Las exportaciones bananeras de Costa Rica tuvieron en el año 2012, principalmente dos destinos: Estados Unidos de Norteamérica (42,9%) y Europa (47,1%), en donde Italia (13,5%), Inglaterra (11,6%), Bélgica (6,8%) y Alemania (6,1%) fueron los principales mercados. Las exportaciones a otros destinos como Japón y el Medio Oriente sumaron en ese año el restante 10% (figura 1). (CORBANA (s.f.). Recuperado el 15 de marzo de 2014, de <http://www.corbana.co.cr/categories/estadisticas-bananeras>).

**Cuadro 4. Cantones productores de banano y su área de siembra.
Año 2012.**

PAÍS	Área (Has.)	%
Matina	9 873	23,85
Pococí	8 394	20,28
Siquirres	8 173	19,75
Sarapiquí	5 619	13,58
Guácimo	3 377	8,16
Limón	3 364	8,13
Talamanca	1 922	4,64
Parrita-Corredores-Osa-otros	704	1,62
Total Nacional	41 426	100,00

Fuente: CORBANA (s.f.). Recuperado el 15 de marzo de 2014, de <http://www.corbana.co.cr/categories/estadisticas-bananas>.

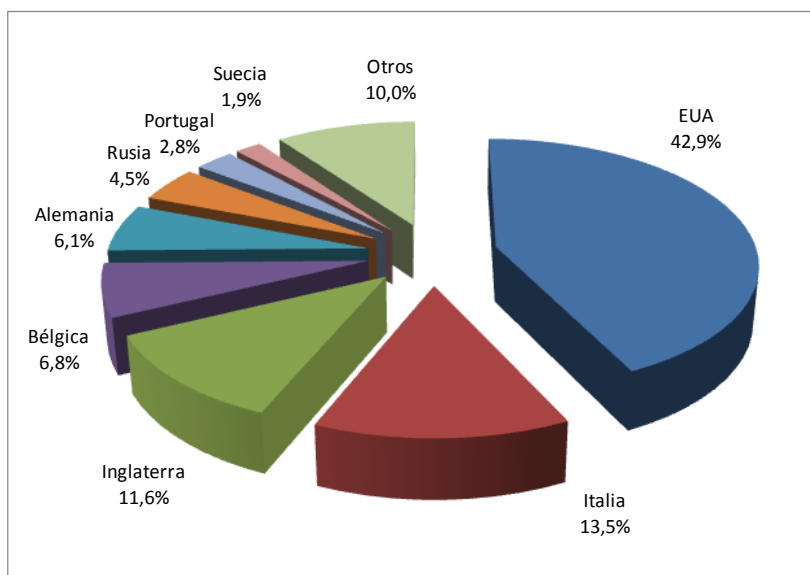


Figura 1. Destino de la exportación de banano de Costa Rica en el año 2012.

Fuente: CORBANA (s.f.). Recuperado el 15 de marzo de 2014. <http://www.corbana.co.cr/categories/estadisticas-bananas>.

En la vertiente atlántica, la actividad bananera genera 40 000 empleos de forma directa y 100 000 de forma indirecta, lo cual representa la principal actividad económica de la vertiente del Caribe. Estos índices a nivel nacional, representaron el 6,9% de la Población Económicamente Activa (PEA), de acuerdo a la Encuesta de Hogares de Propósitos Múltiples (EHPM) del año 2012, realizada por el Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC). (INEC, en CORBANA (s.f.). Recuperado el 15 de marzo de 2014, de <http://www.corbana.co.cr/categories/estadisticas-bananeras>).

2.2 Principales problemas fitosanitarios del banano.

Las plagas y enfermedades del banano son un problema significativo a nivel mundial. Las enfermedades pueden afectar todas las partes de la planta y pueden ser ocasionadas por hongos, bacterias y virus. Las plagas por su parte, a pesar de que parecieran tener una menor importancia general, pueden constituirse también como serios factores limitantes de la producción (Ploetz 2004).

De acuerdo a Ploetz (2004), las enfermedades más importantes son debidas a la acción de hongos como *Mycosphaerella fijiensis* (Morelet) y *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), causantes de la Sigatoka negra y la marchitez por *Fusarium* o “mal de Panamá”, respectivamente.

La Sigatoka negra merece una atención especial pues es considerada como la enfermedad más destructiva y devastadora de las hojas de bananos y plátanos a nivel mundial (Stover 1980 y Marín et al. 2003). Tanto la susceptibilidad de los clones comerciales actuales, como su siembra en grandes extensiones, le dan a enfermedad el potencial para alcanzar *status* epidémico. El patógeno se caracteriza por causar manchas foliares y provocar infecciones que reducen el área fotosintética de las plantas, causando madurez prematura de los frutos y

como consecuencia, la disminución de la producción de fruta en un 38% (Marín et al. 2003).

Para reducir el efecto de este patógeno, se recurre al manejo integrado de la enfermedad, en el cual la aplicación de fungicidas protectantes (mancozeb o clorotalonil) y fungicidas sistémicos (benzimidazoles, triazoles, morpholinas y strobilurinas) de forma alternada, son la principal estrategia de control (Marín et al. 2003, Etebu y Young-Harry 2011).

Igualmente merece atención la enfermedad conocida como “el mal de Panamá”, provocada por el hongo *Fusarium oxysporum*. Este patógeno destruyó en la década de los 1950 las plantaciones de banano del cultivar Gross Michel y motivó la siembra de cultivares del subgrupo Cavendish, resistentes a la raza 2. Esta enfermedad es quizá en este momento, la principal amenaza para el banano de América Latina, el Caribe y África, pues una nueva raza detectada en sudeste asiático en 1990 (la raza 4 tropical o TR4, por sus siglas en inglés), es altamente patogénica a estos cultivares y se encuentra reportada en Taiwan, Indonesia, Malasia, las Filipinas, China y el norte de Australia. En África recientemente (octubre, 2013) fue detectada en Jordán y presuntamente también en Mozambique en noviembre de ese mismo año (Buttler 2013).

En un segundo nivel de importancia dentro de las enfermedades, se encuentran aquellas de naturaleza vascular provocadas por bacterias como *Ralstonia solanacearum* (raza 2) y *Xanthomonas campestris*, causantes de la enfermedad del Moko y la pudrición del Ensete, respectivamente (Ploetz 2004).

Dentro de las enfermedades virales que pueden ocasionar pérdidas significativas, el virus Bunchy top (BBTV), que no ha sido detectado en América y el virus del mosaico de la bráctea (BBMV), son las más importantes. Por el contrario, el virus del rayado del banano (BSV) y el virus del mosaico del banano causado por el virus del mosaico del pepino (CMV), que sí están presentes en la mayoría de las regiones bananeras, provocan daños menores (Ploetz 2004).

En el ámbito de las plagas, Ploetz (2004), señala a los nematodos *Radopholus similis*, *Pratylenchus coffeae*, *P. goodeyi* y *Helicotylenchus multicinctus* (más restringido al subtrópico), como los de mayor distribución e importancia en el banano; asimismo, señala al picudo minador (*Cosmopolites sordidus*), como el insecto plaga de mayor importancia en el cultivo de banano.

De acuerdo a Guillén et al. (2010) y Cubillo (2013), en el ámbito entomológico las plantaciones bananeras en Costa Rica, se ven principalmente afectadas por escamas (*Diaspis boisduvalii*, *Aspidiotus destructor* y *Chrysomphalus aonidium*) y por cochinillas (*Pseudococcus elisae*, *Planococcus citri*, *Dysmicoccus brevipes* y *Ferrisia virgata*), las cuales además de afectar directamente a la fruta provocándole pecas y manchas, tienen carácter cuarentenario en los puertos de destino de las exportaciones.

2.3 El nematodo barrenador del banano, *Radopholus similis* (Cobb) Thorne.

Radopholus similis es considerado como uno de los 10 nematodos más importantes en el trópico, siendo reportado como parásito de más de 250 especies de plantas (Volcy 2011).

Debido a los efectos que provoca en la producción y a que su distribución es mundial, esta especie es considerada como el principal nematodo en el cultivo del banano y del plátano (Pinochet 1986, Araya 2003, Araya y Moens 2003, Jackson et al. 2003, Volcy 2011).

Araya (2003) y Vargas y Araya (2004), señalan que después de *R. similis*, son *H. multicinctus*, *H. dihyseria* y *Meloidogyne incognita*, los más importantes en el cultivo de banano, dejando a *P. coffeae* y *P. goodeyi*, como los de menor importancia. Asimismo, Murray (1980), cataloga a *R. similis* como el parásito que más afecta la producción bananera en el Atlántico de Costa Rica.

Los primeros reportes de la presencia del nematodo en el banano datan del año 1915 en Jamaica y fueron realizados por Nathan Cobb, quien inicialmente describió tres especies del género *Tylenchus*: *T. similis*, *T. granulosus* y *T. biformis*. Thorne en 1949 propuso el género *Radopholus* (Marín et al. 1998).

Su origen muy posiblemente estuvo en el sudeste asiático y no en Australia, de donde inicialmente se creía originario dada la variedad de especies de este género presentes en ese lugar. Se piensa que su ingreso a América pudo ocurrir en la isla La Española (actual República Dominicana) en el año 1516; sin embargo, su principal distribución ocurrió en la década de 1960, con el movimiento de material vegetal Cavendish para sustituir al Gross Michel por efecto del mal de Panamá (Marín et al. 1998).

Radopholus similis es un endoparásito migratorio (Araya 2003, Athman et al. 2007). Los estadíos infectivos penetran las capas de la raíz con poco efecto sobre el cilindro central y vacían el contenido celular del parénquima cortical. Esto resulta en cavidades y túneles y en la necrosis de los tejidos que se tornan rojizos y finalmente negruzcos. Estas lesiones generalmente se unen produciendo la atrofia del tejido radical. En infecciones severas, *R. similis* migra hasta el corno provocando lesiones de color pardo-rojizo-negro, las cuales pueden verse en los hijos recién brotados (Araya 2003).

Las perforaciones hechas por los nematodos y la necrosis que se produce, favorece la pudrición por hongos, bacterias y excesos de humedad. En estados avanzados, las plantas carecen de raíces absorbentes, lo cual afecta directamente a la absorción de agua y nutrientes y provoca el alargamiento del período de crecimiento (Araya 2003, Athman et al. 2007).

Si el daño es significativo, el racimo es de menor peso y la planta, al perder anclaje, puede volcarse (zum Felde et al. 2006, Athman et al. 2007, Papparu et al. 2009). Según Pinochet (1986), el volcamiento en la zona de Guápiles, Costa Rica, puede alcanzar el 20%, siendo el más alto en la región centroamericana.

Además del volcamiento de las unidades de producción (UP) y la consiguiente pérdida de su racimo, la producción también se ve afectada por la disminución del retorno (floraciones de la UP al año), el ratio (cajas por racimo) y a más largo plazo, porque la longevidad de las plantaciones se ve disminuida (Araya 2003).

Las pérdidas económicas por efecto del nematodo en plantaciones comerciales de banano, pueden alcanzar entre el 10 y el 50% (Pocasangre et al. 2004, Pocasangre et al. 2006, Athman et al. 2007); sin embargo, dependiendo de las condiciones agroecológicas y del cultivar, la reducción en el rendimiento puede alcanzar hasta el 80% (Araya 2003), e incluso, al 100% (Araya 2004).

En un estudio de 7 años realizado por Murray (1980), en la zona de Pococí, Costa Rica, se demostró que el hecho de no controlar a *R. similis*, resultó en una reducción significativa de la producción a partir del tercer año después de la siembra. El estudio también demostró que al quinto y sexto año, la productividad alcanzó las 45 y 36 TM ha⁻¹ año⁻¹, respectivamente, en comparación con áreas tratadas en donde la productividad alcanzó entre 55 y 65 TM ha⁻¹ año⁻¹ (cultivar Giant Cavendish). Asimismo, en estudios realizados en Ecuador en el año 2007, se demostró la existencia de una alta correlación negativa entre el número de nematodos totales y de *R. similis*, con respecto al número de manos por racimo y al peso de raíz funcional y de raíz total del hijo (Cháves-Velazco et al. 2009).

La figura 2 muestra los estados de huevo, juvenil y adulto (a); la sintomatología que muestra una raíz afectada (b) y el síntoma visual más característico: el volcamiento de la planta.

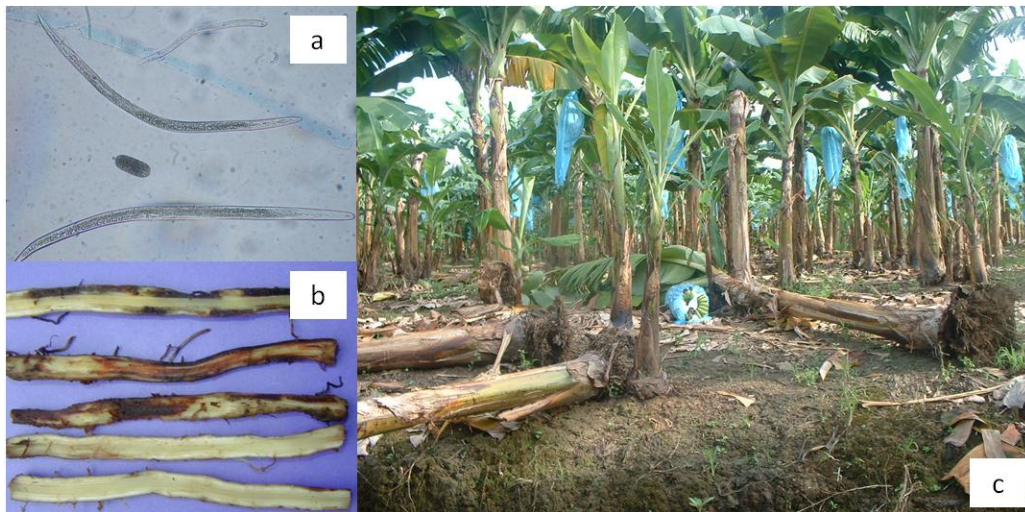


Figura 2. a) Detalle de juvenil, huevo y adulto de *R. similis*; b) daño a la raíz; c) volcamiento de plantas.

Fuente Vargas, CORBANA S.A.

El ciclo de vida de *R. similis* ocurre entre 20 y 25 días (24-32°C). Los huevos eclosionan a los 8 a 10 días después de puestos y los estados juveniles se completan entre los 10 y 13 días. El desarrollo del nematodo pasa por 4 estadios juveniles antes de convertirse en adulto. El primer estadio juvenil (J1), se desarrolla en el huevo y es el único junto con el macho, que no es infectivo. Los otros estadios juveniles y la hembra adulta, son capaces de penetrar la raíz. La migración de los nematodos a raíces nuevas ocurre cuando las condiciones son adversas (Sarah et al. 1996, Brooks 2008, Guzmán 2011).

Este nematodo cumple todo su ciclo de vida dentro del tejido de la raíz y el rizoma la planta, lo cual dificulta su control (Pocasangre et al. 2006). La figura 3 detalla el ciclo del daño que produce *R. similis*.

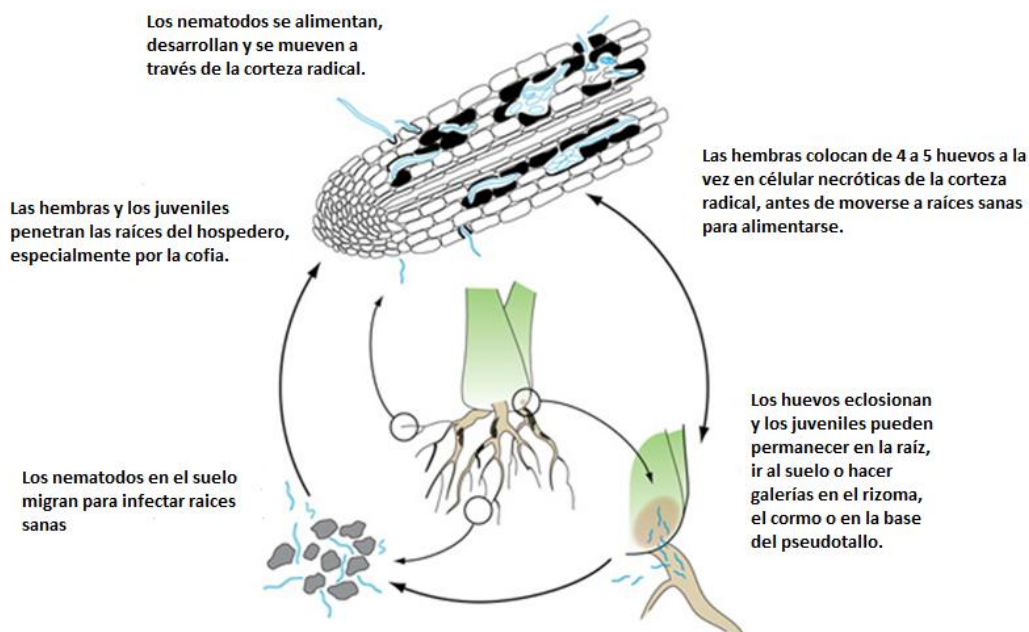


Figura 3. Ciclo de daño de *Radopholus similis*.

Fuente: adaptado de Brooks 2008.

La dinámica poblacional del nematodo está estrechamente relacionada a la fenología de la planta. Su población se acentúa en etapas de prefloración y floración, que es cuando hay una mayor renovación del sistema radical; por el contrario, declina en las fases de crecimiento vegetativo y cerca del período de cosecha del racimo (Quénéhervé, citado por Volcy 2011).

Prefiere raíces primarias y duraderas, en lugar de pelos radicales o raíces terciarias. Espacialmente, la población se establece en los primeros 30 cm de profundidad en donde se encuentra el 90% de la biomasa radicular, y horizontalmente, a 30 cm del pseudotallo (Araya y De Waele 2004)

Se ha comprobado la existencia de una correlación negativa con la precipitación y la altitud sobre el nivel del mar (Quénéhervé et al. 1991). Asimismo, Chávez-Velazco *et al.* (2009), mencionan una posible correlación positiva con el potasio

y el manganeso, mientras que Pattison (2010), señala una relación negativa con el zinc.

Como parámetros para determinar el nivel de daño, se utiliza el peso de la raíz, el peso del racimo y el número de manos (Araya y De Waele 2004). En menor grado se utiliza el diámetro del pseudotallo, el número de hojas funcionales a la floración y el número de dedos de la mano (Fogain 2000).

El nivel de daño es muy variable y depende de las condiciones del entorno; este puede establecerse entre los 1 000 y 20 000 nematodos por 100g de raíz (Quénéhervé 2009, citado por Volcy 2011). Tanto para banano como para plátano, los muestreos de raíz deben realizarse en la base de los hijos de sucesión (Araya y Vargas 1997, Araya y Cheves 1998).

2.4 Manejo Integrado de *Radopholus similis*.

Un efectivo y económico programa de manejo de nematodos requiere la integración de varios métodos, que estos se ajusten a las condiciones locales y que sean continuamente monitoreados, de tal forma que se puedan hacer modificaciones cuando sea necesario (Jackson et al. 2003).

El costo de control del nematodo en plantaciones ya establecidas, es elevado y generalmente requiere de medidas especiales de seguridad (Jackson et al. 2003). Debido a esto y a la alta susceptibilidad de los clones comerciales, en plantaciones nuevas o en renovaciones, la exclusión de los nematodos juega un papel muy importante. En ese sentido se recurre a barbechos, rotación de cultivos, utilización de plantas no infectadas provenientes de cultivo de tejidos (vitroplantas) y al manejo eficiente del agua mediante drenajes, pues las inundaciones pueden distribuir nematodos provenientes de sitios infectados (Sarah et al. 1996, Araya 2003, Brooks 2004, Niere et al. 2004, Risedé et al. 2010, Guzmán 2011).

2.4.1 Actividades para la exclusión.

La limpieza del suelo es la clave para evitar el crecimiento de la población de *R. similis* y otros nematodos. Debido a que estos no desarrollan estructuras de resistencia, en la mayoría de los casos la profilaxis es eficiente en disminuir las poblaciones. En las Indias Francesas del Oeste (islas de Guadeloupe y Martinique), se implementa una estrategia en dos sentidos: el barbecho y el aislamiento del agua mediante diques, de tal forma que se evite la recontaminación por agua de escorrentía (Risedé et al. 2010). El uso de siembras con una conformación en domos, mejora sustancialmente el drenaje y retarda el desarrollo de una nematosis (Araya 2003).

Este barbecho debe iniciar con la destrucción total de las plantas mediante la inyección de pequeñas cantidades de herbicidas al pseudotallo. Es esencial eliminar sistemáticamente todo el material voluntario que aparezca en el lote y cualquier especie de hierba que sirva de hospedero a *R. similis*. Por el contrario, se ha determinado que la rotación o asociación con especies no hospederas como la piña y la caña de azúcar, o bien con pastos como Pangola (*Digitaria decumbens*), *Brachiaria humidicola* y pasto Guinea (*Panicum maximum*) y algunas especies de leguminosas (*Neonotonia wightii*, *Stylosanthes hamata* y *Macroptilium atropurpureum*) resulta en disminuciones significativas del nematodo (Risedé et al. 2010).

La duración del barbecho está relacionada al tipo de cultivo de rotación, a las condiciones físico-químicas del suelo y a la presencia o ausencia de hospederos. Por ejemplo, Sossana y Kosby, citados por Araya (2003), encontraron que la supervivencia de *R. similis* en suelos húmedos libres de hospederos, fue de 14 meses, mientras que en suelos secos, fue de solo tres meses.

Figuroa et al. (1990), encontraron que en un área de renovación de plátano sembrada con *Tagetes* spp, *B. decumbens*, *Mucuna* sp y *Manihot esculenta*, se

redujo las poblaciones de *R. similis*, pero aumentó la de *Helicotylenchus* spp y *M. incognita*. Guzmán (2011), recomienda períodos de barbecho de 6 meses hasta dos años y la eliminación continua de rizomas, colinos (hijos) y otros tejidos, ya que *R. similis* puede sobrevivir en ellos por 6 meses.

Chabrier et al. (2010), evaluaron la sobrevivencia de *R. similis* en barbechos en dos tipos de suelo (Andosol y Nitisol) y encontraron que luego de 180 días, esta era del 21,7% para machos y del 9,8% para hembras. Asimismo encontraron que no había juveniles vivos más allá de 150 días.

El uso de material de siembra libre de nematodos debe ser utilizado siempre en las renovaciones. En ese sentido, las plantas de banano provenientes de cultivo de tejido, representan una oportunidad para usar material limpio (Araya 2003, Risedé et al. 2010, Guzmán 2011). Previo a la siembra de las plantas se recomienda subsolar, discar y rastrear el suelo y dejarlo algunos días para que el sol se encargue de eliminar nematodos remanentes y retardar así la aparición de poblaciones con potencial de generar daño (Araya 2003).

La resistencia genética es una de las opciones más asequibles para el control de nematodos; se ha señalado que esta se da por medio de barreras físicas y por la producción de fitoalexinas y/o compuestos fenólicos (Gowen, Fogain y Gowen, Binks et al., citados por Araya 2003). Las dificultades en el mejoramiento se centran en la poca variabilidad del género *Musa*, en el cual frecuentemente no se da polinización cruzada y cuando la hay, la producción de semillas y su viabilidad es muy reducida (5%) (Pinochet, citado por Araya 2003). No obstante, se han podido generar materiales con cierta resistencia a *R. similis*; tal es el caso del “Goldfinger” (FHIA-01) (Jackson et al. 2003).

2.4.2 Control Químico.

Debido a que las variedades comerciales del subgrupo Cavendish son altamente susceptibles a los nematodos y a que no se cuenta con variedades resistentes (Araya 2003), una vez que estas se infectan, se recurre a la aplicación de insecticidas-nematicidas de la familia de los organofosforados y de los carbamatos, los cuales pueden ser granulados no fumigantes, o líquidos con efecto sistémico, pero que en ambos casos son sustancias muy tóxicas y sólo inactivan a los nematodos en las raíces o en el suelo por un espacio de tiempo limitado (Sikora y Pocasangre 2004, zum Felde *et al.* 2009). La figura 4 muestra detalles de una aplicación de nematicida de formulación granulada (figura 4).



Figura 4. Aplicador de nematicida granulada y aplicación granulada frente al hijo de sucesión.

Fuente: Vargas, CORBANA S.A.

El uso de nematicidas de las familias citadas es una práctica rutinaria en las fincas bananeras, aplicándose entre 2 y 3 ciclos al año, con un costo que oscila entre los US\$350 y US\$500 por hectárea (Pocasangre et al. 2004; Pocasangre, et al. 2006); algunas plantaciones en América Central realizan hasta cuatro aplicaciones de nematicidas al año (Sikora y Pocasangre 2004).

De acuerdo a un estudio realizado por CORBANA (2011) entre los años 2007 y 2009 en 8 fincas bananeras de Costa Rica, para el combate químico de nematodos se realiza entre 3 y 4 ciclos de nematicidas (terbufos, oxamil, ethoprofos, cadusafos y fenamifos) al año. Bajo este esquema el promedio de de aplicación fue de 8,81 kg ia (ingrediente activo) ha⁻¹ año⁻¹, cantidad que a su vez representó el 13,58% del total de ia de plaguicidas que se aplican anualmente. Considerando un área de siembra para exportación de 41.426 has (2012), se podría estimar que al año se aplica un total de 356 TM de ia de nematicidas.

Sikora et al. (2008), señalan que el mercado mundial de nematicidas se estima en us\$800 millones para los vegetales, us\$500 millones para el banano y us\$250 para el algodón. En Costa Rica, Peraza et al. (2009), informan que el mercado de los nematicidas representa el 15% del total de plaguicidas consumidos anualmente en el país.

Según McSorley y Parrado (1986) y Sarah (1989), después de la aplicación de los nematicidas para combatir a *R. similis* y otros nematodos, se han logrado ganancias sustanciales en el rendimiento de entre 20 y 75%. Asimismo, Volcy (2011), señala que en Australia, al aplicar fensulfothion, fenamiphos, oxamil y ethoprophos, se experimentó un aumento en la cosecha del 44, 29, 29 y 21%, respectivamente.

Estas dos experiencias indican en primera instancia, que el uso de los nematicidas es desde el punto de vista técnico y económico, una estrategia eficaz y rentable; sin embargo, desde el punto de vista ambiental, su aplicación puede tener consecuencias negativas, dado que se trata de sustancias de alta

toxicidad (Pocasangre, et al. 2006). Dentro de los plaguicidas, los nematicidas son los más problemáticos debido a que son altamente tóxicos a los humanos, son aplicados al suelo y por lo tanto, son propensos a contaminar mantos acuíferos (Oka 2010).

En ese sentido, se señala que el uso de estos productos representa potenciales efectos negativos en el ambiente, la microflora del suelo y puede afectar las cadenas tróficas y la salud de las personas, en caso de una inadecuada manipulación y aplicación (Noling y Becker 1994, Sarah et al. 1996, Araya 2003, Vetrivelkai et al. 2010, Pattison et al. 2011). Además, algunos de ellos se han vuelto ineficaces como resultado de procesos de biodegradación acelerada provocada por microorganismos cuando son aplicados de forma repetitiva (Sikora y Pocasangre 2004; Pocasangre et al. 2006).

Esta situación logró ser demostrada por Cabrera *et al.* 2010, quienes encontraron que la actividad nematicida de terbufos (organofosforado) contra *R. similis* se redujo significativamente cuando se aplicó en lugares con historial de uso repetitivo de este producto; por el contrario, en sitios en donde nunca se aplicó o en donde por más de un año no se había aplicado, se encontró una alta actividad nematicida del producto. Estudios realizados por Ou, Ou et al., Smelt et al., Karpouzias et al., y Karpouzias y Walker, citados por Cabrera et al. 2010, demostraron la biodegradación acelerada de otras moléculas con efecto nematicida (fenamifos, carbofuran y ethoprophos), en suelos con historial de aplicaciones repetitivas.

Debido a la falta de nuevos nematicidas y variedades de banano resistentes, a la naturaleza de monocultivo del banano, al estancamiento de producción y a toda la problemática que encierra su uso, algunos nematicidas han sido prohibidos totalmente, o tienen que ser utilizados de forma muy restringida (Esnard et al., 1998, Sikora y Pocasangre 2006, Oka 2010). Este proceso ha venido de la mano de una mayor preocupación internacional sobre el uso excesivo de plaguicidas y sobre calidad de los productos entre los

consumidores, lo cual a su vez ha forzado a los productores a reducir el uso de pesticidas químicos. Un caso particularmente significativo sucedió con la prohibición general del uso del bromuro de metilo para el año 2005 (Oka 2010).

En un sentido positivo el uso de los nematicidas, ha producido un particular impulso a la búsqueda de nuevas estrategias y dentro de estas, se ha apelado al desarrollo de bioplaguicidas microbianos (Elsen et al. 2008).

Debido a las restricciones en el uso de los nematicidas, ya sea fumigantes o no, así como a la baja efectividad de algunos de ellos, es necesario desarrollar nuevas estrategias ambientalmente amigables de control, para incorporarlas dentro del manejo integrado de estos organismos (Pocasangre, et al. 2006, Sikora y Pocasangre 2006, Athman et al. 2007, Tian et al. 2007, Paparu et al. 2007, Tabarant et al. 2011).

Dentro de las alternativas con mayor potencial, el aporte de microorganismos y el control biológico aplicado, ha adquirido en los últimos años mayor interés (Mendoza, et al. 2008).

El factor económico juega un papel importante en el desarrollo de alternativas biológicas, ya que el desarrollo y comercialización de una molécula química demora entre 8 y 12 años y tiene un costo de us\$35-45 millones; en contraste, el desarrollo de un bioinsecticida (por ejemplo), requiere al menos 3 años y tiene un costo promedio de us\$5 millones (Hope 1989). Van Lenteren (2011), indica que el desarrollo e implementación de un sistema de control biológico aumentativo mediante insectos benéficos implica una inversión de us\$2 millones en un lapso de 10 años, en contraste con los us\$256 millones que cuesta el desarrollo de un plaguicida sintético.

2.5 Uso de microorganismos en el combate de nematodos.

El manejo de los nematodos parasíticos de plantas (fitoparásitos) es más difícil que el de otras plagas porque estos mayoritariamente habitan el suelo y usualmente atacan partes de la planta que se encuentran en el subsuelo (Stirling, citado por Tian *et al.* 2007).

Siendo *Radopholus similis* un endoparásito migratorio, su regulación biológica pareciera restringirse a microorganismos que colonicen de forma íntima la rizósfera o que tengan carácter endofítico (colonización interna). Según Araya (2003), dado que los cuatro géneros que afectan al banano y al plátano penetran, se desarrollan y completan su ciclo de vida dentro de las raíces de la planta, primero se tiene que “afectar” la planta, para luego “afectar” al nematodo.

En ese sentido se ha generado a lo largo de los últimos 20 años, profusa investigación y conocimiento que pone de manifiesto el efecto positivo de agentes de control biológico de nematodos, principalmente hongos y bacterias (Tian *et al.* 2007).

Más recientemente, con el aporte de la biología molecular, se ha identificado una serie de microorganismos (endofíticos o epifíticos) que colonizan la raíz y dificultan la infección de estos organismos, o que brindan a las plantas una condición más tolerante a su ataque. Estos microorganismos se han identificado en sitios denominados “supresivos” en donde las plantas susceptibles desarrollan poblaciones bajas de nematodos, en comparación con sitios denominados “conducivos”.

La endomicorrización (colonización endofítica con hongos) es un aspecto de manejo con gran futuro en el cultivo de banano, principalmente con rizobacterias, aislamientos no patogénicos de *Fusarium oxysporum* y hongos vesículo-arbusculares del género *Glomus* (*G. intraradices* y *G. mosseae*) (Volcy 2011). En esta línea de investigación, se ha comprobado que la inoculación de

vitroplantas durante su proceso de aclimatación, antes de llevarlas al campo, resulta en materiales más vigorosos y menos susceptibles al ataque de los nematodos (Coyne et al. 2006, zum Felde et al. 2006, Mendoza et al. 2006).

Por último, se ha determinado el efecto positivo de la adición de enmiendas orgánicas, dado que estas resultan en la activación de las cadenas tróficas en el suelo y en la consiguiente regulación de los nematodos (Chen et al. 2000).

Debido a la mayor facilidad de análisis genético y bioquímico, así como a una mayor facilidad de cultivo y escalamiento de las bacterias respecto a los hongos, estas han sido mayoritariamente investigadas (Kim et al. 2003). Huang et al. (2005), señala que estas mismas ventajas, han incidido en un uso extensivo de bioplaguicidas a base de bacterias para el combate de nematodos del suelo, siendo que algunos de ellos han logrado alcanzar incluso, mejores niveles de control que los de naturaleza química.

Según Tian et al. 2007, las investigaciones realizadas a lo largo de los años, han demostrado que las bacterias nematófagas tienen una amplia distribución, poseen diferentes modos de acción y un amplio rango de hospederos.

Sea cual sea la naturaleza del microorganismo o el mecanismo que participa en la supresión, es deseable que este cumpla con tres criterios: alta especificidad hacia el organismo meta; fácil degradabilidad luego de su aplicación y costo bajo de masificación de la producción (Kim et al. 2003).

A continuación se resumen las tres líneas de investigación (control biológico con hongos y bacterias, mejoramiento biológico del material de siembra y aplicación de materia orgánica) brindando especial atención a *Radopholus similis* y los demás nematodos que afectan al banano.

2.5.1 Control biológico de nematodos.

El control biológico como alternativa a los nematocidas ha sido a lo largo de 25 años, el mayor tópico en las investigaciones nematológicas dirigidas al combate de nematodos fitoparásitos; sin embargo, a pesar de haber encontrado mucho potencial en la aplicación de esta herramienta en muchos cultivos, los avances en el cultivo de banano han sido mínimos y se han restringido principalmente al hongo *Paecilomyces lilacinus* (Sikora y Pocasangre 2006).

Las razones por la que los productos biocontroladores rara vez llegan al mercado son varias: a) tamaño del mercado; b) competencia con otros productos; c) costos de registro; d) costos de producción; e) formulación y durabilidad del producto; f) tecnología de aplicación; g) espectro de actividad; h) aceptación por el productor; i) incremento en la cosecha; j) toxicología, y k) margen de ganancias (Sikora y Pocasangre 2006).

El control biológico de nematodos puede ser llevado a cabo por hongos, bacterias o combinaciones entre ambos, lo que normalmente se ha traducido en efectos sinérgicos.

2.5.1.1 Control biológico de nematodos mediante hongos.

Dentro del grupo de los hongos que no se consideran como endofíticos, se ha encontrado potencial en aquellos que poseen actividad parasítica (hongos nematófagos) y son productores de quitinasas y serín proteasas, como *Paecilomyces lilacinus*, *P. marquiandii*, *P. variotti*, *Drechmeria conidiospora*, *Pochonia chlamydosporia*, *Aspergillus niger*, *Myrothecium sp* y *Penicillium oxalicum*, así como en hongos atrapadores como *Candellabrella musiformis*, *Dactylella sp* y *Arthrobotrys spp* (Esnard et al. 1998, Mendoza et al. 2006, Khan et al. 2006, Orozco et al. 2006, López y Margalef 2010). Terefe et al. (2009), reporta también efecto parasítico de los hongos *Hirsutella rhossiliensis*, *Dactylella ovoparasítica* y *Cylindrocarpon destructans*.

En estudios realizados en condiciones de vivero con plantas de banano, se identificó un efecto positivo de la aplicación de *P. marquandii*, de la bacteria *Bacillus thuringiensis* y la actinobacteria *Streptomyces costarricanus* sobre *R. similis* y *Helicotylenchus multincinctus*, principalmente cuando el sustrato de siembra se enmendó con trigo macerado (Esnard et al. 1998).

Un efecto similar de control de estos tres microorganismos fue encontrado por (Chen et al. 2000) sobre *Meloidogyne hapla* en lechuga (*Lactuca sativa*); sin embargo, en este caso, la incorporación de las enmiendas (quitina, compost de cervecería y trigo macerado), en suelos no fumigados con bromuro de metilo, no incrementó los niveles de control y de crecimiento del cultivo.

Adicionalmente, la producción combinada de quitinasas y proteasas extracelulares de *P. lilacinus* y *Pochonia chlamidosporia* y su efecto contra *Meloidogyne* spp, fue identificada por Wei et al. (2009) en estudios de vivero y campo con plantas de tomate.

2.5.1.2 Control biológico de nematodos mediante bacterias.

Diferentes estudios han demostrado la acción antagónica de bacterias (endofíticas y de vida libre) hacia los nematodos y estas se agrupan dentro de los géneros *Actinomyces*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Aureobacterium*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Brevibacillus*, *Burkholderia*, *Chromobacterium*, *Clavibacter*, *Clostridium*, *Comamonas*, *Corynebacterium*, *Curtobacterium*, *Desulfovibrio*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Gluconobacter*, *Hydrogenophaga*, *Klebsiella*, *Methylobacterium*, *Pasteuria*, *Phyllobacterium*, *Phingobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces* (actinobacteria) y *Variovorax*, sobre diferentes especies de nematodos, incluyendo a *R. similis*. De estas, solo *Pausteria penetrans* es considerada como parasítica a nematodos (Siddiqui y Mahmood 1999, Tian et al. 2007, Terefe 2009).

Es importante primero definir qué es una bacteria rizosférica y qué es una bacteria endofítica. Las primeras son bacterias (rizobacterias) que tienen la habilidad de colonizar la raíz de las plantas (Siddiqui y Mahmood 1999); por el contrario, las bacterias endofíticas pueden definirse como: a) cualquier bacteria (estrictamente hablando) que se encuentran dentro de los tejidos internos de las plantas; b) la anterior definición, incluyendo a patógenos activos o latentes; c) bacterias que viven dentro de los tejidos de las plantas sin provocan efectos negativos en estas; d) bacterias que viven dentro de los tejidos de las plantas en una relación de mutualismo (Lodewyckx et al. 2002).

Se reportan más de 80 géneros de bacterias endofíticas, tanto Gram positivas, como Gram negativas, siendo los géneros *Pseudomonas* y *Enterobacter* los dominantes (Lodewyckx et al. 2002).

Otra clasificación de las bacterias que controlan nematodos tiene que ver con la forma en la cual interactúan con su huésped, pudiendo ser estas parasíticas (*P. penetrans*), parasíticas oportunistas (*Brevibacillus laterosporus* y algunas cepas de *Bacillus* sp), rizobacterias, bacterias formadoras de proteínas *Cry* (*Bacillus thuringiensis* y *B. sphaericus*), bacterias endofíticas y bacterias simbioses (*Xenorhabdus* ssp y *Photorhabdus* spp) (Tian et al. 2007).

De los géneros considerados como no parasíticos con presencia tanto endofítica, como epifítica (rizobacteria), *Bacillus* merece especial atención pues ha sido repetidamente reportado como agente de control de un importante número de órdenes de insectos, y más recientemente de nematodos. Este género junto con *Pseudomonas*, es considerado como dominante a nivel de la rizósfera y con capacidad de antagonizar con nematodos (Tian et al. 2007).

Bacillus es un género que agrupa a bacterias Gram positivas, formadoras de esporas (endósporas), que habita el suelo como saprófito (Rodas-Junco et al. 2009). Esta bacteria se caracteriza por poseer una variedad de plásmidos que

contienen genes que codifican para proteínas insecticidas llamadas δ -endotoxinas o simplemente proteínas *Cry*.

Dentro de este grupo, la especie más conocida y explotada como agente de control biológico es *B. thuringiensis*, la cual viene siendo utilizada desde 1970. Datos del año 1986 indicaban que entre el 90 y el 95% de los estudios biotecnológicos dedicados al desarrollo de insecticidas microbianos, estaban relacionados a esta bacteria; existen además en el mundo, registros de al menos 60 000 aislamientos de esta bacteria (Hope 1989, Márquez y Fernández 2006).

El gran potencial de *B. thuringiensis* como agente de control biológico, es una mezcla de factores y características propias de la bacteria, tales como su especificidad e inocuidad hacia insectos benéficos, aves, peces, mamíferos y plantas (Carreras-Solís 2009, Niedmann-Lolas y Meza-Bazo 2006); su amplia distribución en diferentes tipos de ambientes como el suelo, los ecosistemas de agua dulce y marinos; su alta resistencia a la desecación y al calor por la presencia de endósporas (Badia et al. 2011); y debido a los avances en la producción masiva de *B. thuringiensis* logrados a lo largo de 40 años (Fernández-Larrea et al. 2009).

Su reconocido efecto sobre diferentes especies de nematodos y su gran potencial en el combate biológico, hacen que su búsqueda en los hábitats naturales se haya convertido en una práctica internacional que ha permitido aumentar sus posibilidades de uso en la agricultura.

Estudios realizados por Noel (1990), bajo condiciones de invernadero con plantas de soya (*Glycine max*), señalan la participación de la δ -endotoxina denominada como thuringiensina (producida por *B. thuringiensis*), como agente causal de la mortalidad del nematodo *Heterodera glycines* y sugieren un mecanismo de acción diferente al que esta toxina desarrolla en los insectos. Este razonamiento resulta en que ambos organismos (insectos y nematodos)

poseen diferentes mecanismos de alimentación y aparatos funcionales para hacerlo (Noel 1990). En ese sentido, Mendoza et al. (2008) y Márquez y Fernández (2006), señalan que el tamaño de las bacterias en relación con el lumen (abertura) del estilete, les hace imposible a estas ingresar de forma pasiva al cuerpo de los nematodos parasíticos. Márquez y Fernández (2006), indican que esa imposibilidad se da también para el ingreso de la δ -endotoxina *per se*, la cual al no poderse descomponer en el tracto digestivo, deja en las exotoxinas, el efecto nematicida.

El efecto nematológico de *B. thuringiensis* fue posteriormente asociado a los cristales proteicos de las clases *Cry V* y *Cry VI* (Leyns et al. 1995). En estudios *in vitro*, Marroquin et al. (2000), encontraron efecto letal de las toxinas *Cry5*, sobre el nematodo bacteriófago *Caenorhabditis elegans*, lo cual básicamente consistió en una morfología interna envejecida, coloración pálida, movimientos lentos y en una menor capacidad reproductiva. En este estudio no se observó efectos sobre el sistema nervioso ni sobre el sistema muscular; sin embargo, a mayores concentraciones de la toxina, los nematodos sufrieron síntomas similares a los exhibidos por los insectos afectados por *Cry1Ab* a nivel de intestino.

Más recientemente, en un estudio de caracterización de 70 aislamientos de *B. thuringiensis*, se señaló la presencia de 6 familias de proteínas *Cry* con efecto nematicida (*Cry5*, *Cry6*, *Cry12*, *Cry13*, *Cry14* y *Cry21*) en 22 aislamientos, siendo la más frecuente la familia *Cry6*, con un 22,8% del total (Salehi Jouzani et al. 2008). Estudios posteriores con plantas de tomate utilizando mezclas de cristales y endósporas de estas 22 bacterias, mostraron niveles de mortalidad de entre 0 y 100% sobre *M. incognita*. Los cuatro aislamientos con mayores índices de mortalidad se evaluaron *in vitro* en dos dosis ($1,0 \times 10^8$ y $2,0 \times 10^8$ UFC/ml), encontrándose a los 3-4 días, inhibición de la eclosión de los huevos y mortalidad en aquellas larvas que emergieron. Todos los tratamientos mostraron efecto nematicida hacia *M. incognita* con un máximo del 81%. La

dosis mayor aportó un 10% más de mortalidad. La inhibición de la eclosión de huevos tuvo un máximo del 46%. Aunque se ha reportado en nematodos bacteriófagos como *Panagrellus redivivus* (Salehi Jouzani *et al.* 2008) y *Caenorhabditis elegans* (Marroquin *et al.* 2000), un mecanismo de acción similar a los que se produce en los insectos, no se descarta un efecto de contacto producido por toxinas.

Por su parte, Márquez y Fernández (2006), al evaluar *in vitro* a 37 aislamientos de *B. thuringiensis*, encontraron en aquellas con efecto nematicida, una mayor predominancia de la variedad *kurstaki*, y en menor escala, de las variedades *morrisoni* e *israelensis*. Se observó huevos necrosados y un desarrollo embrionario afectado, con deformidades e incluso, detenido. Los juveniles presentaron vacuolización interna, deformaciones del sistema digestivo y ausencia de respuesta ante el estímulo luminoso. Se determinó además, que el efecto sobre la eclosión de juveniles de *M. incognita* se prolongó por 15 días y este fue mayor al utilizar al sobrenadante; sin embargo, este tratamiento no difirió significativamente respecto al cultivo completo. Los resultados sugieren que las exotoxinas termoestables del sobrenadante tuvieron la mayor efectividad. Considerando lo anterior, se sugirió un efecto estrictamente tóxico.

Otros estudios con *B. thuringiensis*, que han mostrado potencial de control de *M. incognita* fueron realizados por Chen *et al.* (2000); Márquez y Fernández (2006) y Salehi-Jouzani *et al.* (2008).

El efecto de regulación de nematodos y de promoción de crecimiento tanto de *Bacillus* como de *Pseudomonas* aisladas en suelos supresivos a *M. incognita*, ha sido confirmado por Siddiqui *et al.* (2009) en estudios realizados *in vitro* y en invernadero con plantas de arveja (*Pisum sativum*). Aunque *Pseudomonas* superó el efecto de *Bacillus*, posiblemente por su mejor colonización radical, ambas bacterias inhibieron la eclosión de huevos del nematodo, promovieron un mayor crecimiento vegetal y redujeron en número de agallas y del nematodo en las raíces. La producción de sideróforos, cianuro de hidrógeno (HCN) y ácido

indolacético (IAA), fue comprobada para *Pseudomonas*; sin embargo, la producción de estas sustancias, ha sido comprobada en ambos géneros, confiriéndole a las plantas supresividad a enfermedades mediante mecanismos de competencia por Fe (III), inhibición por compuestos volátiles, inducción de resistencia, agresiva colonización de la rizósfera y estimulación del crecimiento (Siddiqui et al. 2009).

Quirós et al. (2012), al comparar la diversidad (índice de Shannon) y riqueza de microorganismos en muestras de suelo rizosférico, suelo no rizosférico y raíz extraída de dos suelos bananeros catalogados supresivo y conducivo a *R. similis*, pertenecientes a una misma finca bananera, encontraron una mayor diversidad de géneros de bacterias en el suelo supresivo, pero esta fue proporcional en cuanto al número de especies dentro de cada uno. Esta mayor diversidad se asoció principalmente a una mayor presencia de actinomicetes y bacterias en general. Dentro de las bacterias, se encontró una mayor presencia de *Bacillus* spp en suelo no rizosférico. Estos resultados según lo sugieren los autores, indican que la actividad supresora al nematodo podría estar asociada en parte a bacterias.

Otra característica determinante que le confiere a *Bacillus* gran potencial de uso en la industria y el control biológico, es su capacidad para producir enzimas quitinolíticas y proteolíticas. Es ampliamente conocido que ambos tipos de sustancias, son constituyentes importantes del exoesqueleto de los insectos, de la cutícula de los huevos, estados juveniles y adultos de los nematodos y de las paredes celulares de los hongos.

QiuHong et al. (2006), en estudios realizados con un aislamiento de *Bacillus*, encontraron actividad nematicida de la serín-proteasa (proteasa extracelular) sobre el nematodo de vida libre *Panagrellus redivivus*. Asimismo, Rodas-Juncos (2009) señala que otros representantes del género *Bacillus* con acción lítica son *B. thuringiensis* var. *israelensis*, *B. thuringiensis* var. *aizawai* y *B. cereus*.

No obstante la gran cantidad de investigaciones que señalan la actividad supresora de *B. thuringiensis* sobre numerosas especies de nematodos, Tian et al. (2007) indican que la bacteria más estudiada con ese objetivo ha sido más bien *Bacillus subtilis*.

Bacillus firmus han mostrado gran potencial tanto *in vitro*, como en invernadero sobre *Meloidogyne incognita* y *Ditylenchus dipsaci* (Mendoza et al. 2008; Terefe et al. 2009). Jonathan y Umamaheswari (2006), reportó que un aislado endofítico de *B. firmus* aplicado en formulación en talco a plantas de banano bajo condiciones de vivero, redujo el número de nematodos (*R. similis*, *Pratylenchus coffeae*, *Helicotylenchus multicinctus* y *Meloidogyne incognita*) y produjo incrementos en altura y peso de la parte aérea y de la raíz, así como un mayor número de hojas. En este estudio se logró identificar una mayor actividad de enzimas de defensa en las plantas inoculadas con *B. firmus*, tales como la peroxidasa, la polifenol-oxidasa y la fenilalanina-amonioliasa, las cuales se sabe que participan en la inducción resistencia sistémica.

Esta bacteria ha sido también asociada al control de otras especies de nematodos como *M. hapla*, *Heterodera* spp, *Tylenchulus semipenetrans* y *Xiphinema index* (Terefe et al. 2009).

De acuerdo a los estudios *in vitro* realizados por Mendoza et al. (2008), sobre *R. similis*, *M. incognita* y *D. dipsaci*, filtrados crudos de *B. firmus* produjeron significativas tasas de parálisis y mortalidad de los tres nematodos, y de reducción en la eclosión de *M. incognita*. Además, suspensiones celulares libres de sustancias extracelulares, redujeron en un 41% la sobrevivencia de *R. similis*.

Lo anterior demuestra la actividad tanto de metabolitos secundarios, como de proteasas extracelulares, lo cual concuerda con estudios que han encontrado actividad de compuestos nematocínicos producidos por *Bacillus* sp, *B. nematocida*, *B. thuringiensis*, *Burkholderia ambifaria* y *P. cepacia*, así como de

diferentes enzimas con actividad lítica, como proteasas, quitinasas y colagenasas (Wei et al. 2003. QiuHong et al. 2006).

Otras especies dentro del género *Bacillus* reportadas con efecto nematicida son: *B. cereus*, *B. pumilus* y *B. lincheniformis* (Siddiqui y Mahmood 1999).

La mezcla de diferentes bacterias (*B. thuringiensis*, *B. subtilis* y *P. cepacia*) y hongos (*Trichoderma* spp, *Clonostachys* sp y *Lecanicillium lecanii*) ha sido también sujeta a estudio en experimentos de vivero con plantas de banano, sobre la reproducción de *R. similis*, encontrando para *B. thuringiensis* y la mezcla *B. thuringiensis* + *B. subtilis*.+ *P. cepacia*, niveles de control del 51 y 67%, respecto al testigo inoculado con nematodos y sin la aplicación de agentes de control. La aplicación de *B. subtilis* y de la mezcla de las tres bacterias, resultó además en un mayor crecimiento vegetativo, incluso superando el testigo comercial con el nematicida Vydate® (oxamyl). Los hongos aportaron menores niveles de control (35%), sin observarse diferencias significativas. En un segundo experimento con los hongos, *B. subtilis* y *Streptomyces* sp, su aplicación en forma conjunta redujo el número de nematodos en 47%, y en forma individual, *B. subtilis* redujo en 39%, *Trichoderma* sp en 33% y *Streptomyces* sp en 30%, sin diferir estadísticamente del testigo inoculado con nematodos (Vargas y Araya 2007).

En resumen, los mecanismos de acción mediante los cuales las bacterias afectan a los nematodos son variados, e incluyen: el parasitismo directo (bacterias parasíticas como *P. penetrans*); el efecto de metabolitos secundarios, enzimas, toxinas y antibióticos; la competencia por nutrientes como por ejemplo, hierro; la disrupción del reconocimiento del hospedero; cambio en el comportamiento de los nematodos durante la fase de penetración a la raíz, la resistencia sistémica inducida y promoción de crecimiento (Siddiqui y Mahmood 1999, Tian et al. 2007, Mendoza et al, 2008, Terefe et al. 2009).

Estos mecanismos han sido también descritos como aportes de las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés) a las cuales se les asocia además con la liberación de fitohormonas, la mejora en la disponibilidad de nutrientes, la competencia por espacio y la reducción en la producción de etileno (Vetrivelkalai et al. 2010).

Mediante la prospección y aislamiento en diferentes regiones geográficas, ha sido posible el enriquecimiento de los ceparios que conservan bacterias de mucha utilidad como *B. thuringiensis* (Carreras-Solís 2009). Salehi-Jouzani et al. (2008) indican que la búsqueda de cepas nativas de bacterias con actividad a nematodos fitoparásitos, podría tener un impacto mundial en su control.

En ese sentido, su aislamiento a partir de un suelo supresivo a nematodos y la implementación de un sistema para determinar su potencial *in vitro*, podría marcar el inicio del diseño de un agente de combate biológico eficaz, para incorporarse dentro del manejo integrado de nematodos en banano y contribuir con una menor dependencia al uso de los nematicidas químicos.

2.5.1.3 Control biológico combinado: hongo – bacteria.

Estudios realizados por Mendoza y Sikora (2008), demostraron a nivel de vivero con plantas de banano, una mayor efectividad de control de *R. similis* cuando aplicaron dos diferentes microorganismos de forma secuencial, frente a la aplicación de uno solo. La combinación de *Fusarium oxysporum* con *P. lilacinus*, la combinación de *F. oxysporum* con *Bacillus firmus* y la combinación de *P. lilacinus* con *B. firmus*, incrementó en 68,5, 86,2 y 91,0%, respectivamente, la mortalidad del nematodo en comparación con el testigo no tratado. El porcentaje promedio de mortalidad observado con los microorganismos aplicados en forma aislada, resultó en valores significativamente inferiores.

La mezcla bacteria- hongo, ha resultado tener un efecto sinérgico en el combate de *Meloidogyne mayaguensis*, tanto en condiciones de laboratorio, como en invernadero, lo cual podría explicarse en la concentración de dióxido de carbono (CO₂), etileno, amonio, aminas, alcoholes, compuestos sulfúricos y ácidos grasos de bajo peso molecular. A este tipo de bacterias se les denomina Bacterias Colaboradoras de Hongos Nematófagos (NHB, por sus siglas en inglés) (Duponnois et al. 1998).

2.5.2 Mejoramiento biológico de plantas con microorganismos endofíticos provenientes de suelos supresivos.

El concepto de suelo supresivo nace entre los fitopatólogos en 1933, en estudios de supresividad a patógenos del suelo (Sikora y Pocasangre 2006, Sikora et al. 2008).

Desde el punto de vista estrictamente biológico, un suelo supresivo es aquel en el cual, debido a la presencia y actividad de un número no determinado de microorganismos, una planta susceptible en presencia de un agente patogénico puede: a) ser no susceptible a su establecimiento; b) ser susceptible a su establecimiento, pero sin mostrar síntomas de la enfermedad, ó, c) ser susceptible al establecimiento del patógeno y mostrar la enfermedad, pero por un tiempo limitado (Cook y Baker 1983).

La supresividad es un término “*paraguas*” que abarca la actividad de control biológico basado en parasitismo, depredación, inhibición, competición y otras interacciones antagonistas con agentes patológicos. En esta condición se experimenta una infección reducida del agente, en presencia de una planta hospedante susceptible. La supresividad está directamente relacionada con el nivel del potencial antagonista en el suelo, al cual a su vez está regulado por los componentes específicos de las comunidades microbianas de la rizósfera (Sikora y Pocasangre 2004).

Existen dos tipos de supresividad aplicable a los nematodos: la específica y la general. La supresividad específica es aquella derivada de la acción de uno o varios organismos que antagonizan con los nematodos y regulan las poblaciones; tal es el caso de patógenos de huevos, hongos depredadores y atrapa-nematodos, hongos endofíticos, bacterias y nematodos depredadores. Por el contrario, la supresividad general no se debe a uno o a varios organismos, sino que es la suma de la actividad de la biomasa microbiana total, la cual puede por muchos años suprimir la actividad de los nematodos (Pattison 2011). Westphal (2005) señala que la diferencia entre ambas es que la supresividad específica es transferible y la general, no.

Los suelos considerados supresores se ha observado una menor cantidad de nematodos totales, principalmente como resultado de una menor presencia de *Radopholus similis* que es la especie dominante. Asimismo, se ha observado que estos suelos inducen a una mayor producción, en comparación con suelos no supresivos (también llamados conducivos) dentro de una misma finca. En muestreos realizados en una finca comercial de banano con 20 años de haberse sembrado, el área supresiva a *R. similis* mostró en promedio 8.546 nematodos totales en 100g de raíz, mientras que el área conduciva mostró 26.865 (reducción del 68,2%). Adicionalmente se encontró que en el área supresiva, el 61% de la población total era de *Helicotylenchus* sp, mientras que en el área conduciva, el 90% era de *R. similis* (Vargas et al. 2012). Estas diferencias podrían ser el reflejo de una pérdida de la dominancia de *R. similis* frente a *Helicotylenchus* sp en un suelo supresivo.

La confirmación de la naturaleza biológica de un suelo supresivo a nematodos del banano fue demostrada a nivel de vivero con vitroplantas de banano por Vargas et al. 2012. En este estudio, la infección de los nematodos fue mayor en un suelo supresivo que fue esterilizado, en comparación con otro que no lo fue. Zum Felde et al. (2009), también señala la naturaleza biótica de la supresividad

La supresividad de suelos a nematodos que atacan al banano, ha sido confirmada a través de diferentes estudios (Pocasangre et al. 2000, zum Felde 2002, Cañizares 2003, zum Felde et al. 2005, Sikora y Pocasangre 2006); como resultado de estos, los autores concluyen que la supresividad no está en la microflora del suelo, sino en la planta misma, a través de las propiedades que los microorganismos le aportan a esta (Sikora et al. 2008).

Sikora y Pocasangre (2004), Sikora y Pocasangre (2006) y Sikora et al. (2008), señalan que podría haber una cuota más alta de efectividad, cuando los organismos son obtenidos de la endorriza de plantas en suelos caracterizados como supresivos a nematodos. No obstante, el éxito que han tenido los nematicidas sintéticos en proteger el sistema radical del banano del ataque de los nematodos, irónicamente ha dificultado la detección de este tipo de suelos. A esto se le ha llamado "*enmascaramiento por pesticidas*" (*pesticides masking*).

Está demostrado que a través de la raíz, las plantas pierden hasta el 33% de sus asimilados del suelo y aunque esto representa una inversión importante de energía, tiene un beneficio, pues los exudados emitidos permiten el mantenimiento de comunidades microbianas diversas y activas en la rizósfera y la endorriza, con la consiguiente mejora en la salud y actividad del sistema radical, aspecto básico para absorción de agua, nutrientes y para la defensa de la planta ante agentes patológicos (Sikora y Pocasangre 2004).

El concepto de mejoramiento biológico (*biological enhancement*) definido como "*el tratamiento del material de siembra con microorganismos mutualísticos no patogénicos, que son competentes a nivel de rizósfera o que crecen endofíticamente, para incrementar la sanidad de la planta*" (Sikora y Pocasangre 2006), se enfoca en un control eficiente de posibles patógenos en la "patozona", lo cual evita la temprana entrada de los nematodos y la generación de niveles severos de daño y de afección a la cosecha (Sikora y Pocasangre 2006, Sikora et al. 2008).

El mejoramiento biológico de plantas de banano provenientes del cultivo de tejidos con hongos endofíticos mutualistas aislados de la raíz del banano presente en suelos supresivos, es una de las opciones de combate de nematodos más promisorias. Tal es el caso de hongos endofíticos como *Fusarium oxysporum* de razas no patogénicas a los bananos del subgrupo Cavendish, *Trichoderma atroviridae* (Paparú et al. 2006, Pocasangre et al. 2006, Athman et al. 2007, Paparú et al. 2007, Paparú et al. 2009, Sikora et al. 2008, zum Felde et al. 2009), o bien, mediante hongos micorrízico-arbusculares de la especie *Glomus intraradices* (Elsen et al. 2008).

Athman et al. (2007) al inocular vitroplantas de banano con el hongo *F. oxysporum*, no encontraron una reducción significativa en la penetración de *R. similis* a la raíz, pero sí un decrecimiento en la reproducción del nematodo.

Según Sikora y Pocasangre (2004), en condiciones naturales, las densidades de población de los microorganismos endofíticos son bajas y esto los hace poco eficaces para suprimir a los patógenos. Por el contrario, la potenciación biológica en la cual mediante la inoculación artificial de determinado (s) agente (s), se asegura una mayor colonización, proporciona una protección más efectiva contra los patógenos con los que se va a enfrentar en el campo.

En cuanto a los hongos endofíticos, pareciera que el hongo más promisorio podría ser *Fusarium oxysporum*, el cual activa mecanismos de defensa ante *R. similis* (Athman et al. 2007); este hongo es además, encontrado en una alta frecuencia, tanto en raíces como en el cormo de las plantas de banano, aunque con una mayor frecuencia en las raíces (Pocasangre et al. 2000). En estudios conducidos por Pocasangre et al. (2000), utilizando vitroplantas de banano inoculadas con este hongo, se logró demostrar reducciones en la infección de *R. similis* de hasta el 90%. Estudios posteriores realizados por Pocasangre et al. (2004) con 28 aislamientos endofíticos de *Fusarium* sp y *Trichoderma* sp, señalaron la reducción de la penetración de *R. similis*, y consiguientemente, una menor presencia del nematodo en raíces de plantas de banano bajo

condiciones de vivero. En este caso los aislamientos de *Fusarium* sp aportaron mayores reducciones que los de *Trichoderma* (71-72%, contra 17-35%, respectivamente).

Paparu et al. (2006), encontraron diferencias en el nivel de colonización de *F. oxysporum* en raíces y rizoma de vitroplantas de banano dependiendo del sistema de inoculación; la inoculación con sustrato sólido permitió los niveles más altos de colonización, por lo que se especuló que esto podría resultar en mayores niveles de control de *R. similis* y *Cosmopolites sordidus* (picudo negro).

Por otra parte, Niere et al. (2004), encontraron altos niveles de actividad nematocida *in vitro* de varios aislamientos de *F. oxysporum*, así como niveles moderados de reproducción de *R. similis* en plantas de banano hasta 7 meses después de la inoculación.

La inoculación dual de *F. oxysporum* y *T. atroviridae* ha resultado en mejores índices de crecimiento de plantas de banano, así como en mayores niveles de reducción de las poblaciones de *R. similis* en condiciones de vivero (zum Felde et al. 2006), lo cual puede deberse a la sumatoria del efecto de dos modos de acción diferentes (Paparu et al. 2009).

Son pocos los trabajos que se han realizado para verificar el efecto de estos microorganismos a nivel de campo. Los resultados de uno de ellos fueron reportados por Pocasangre et al. (2006), con base en un estudio realizado en dos fincas bananeras de la región Caribe de Costa Rica. Plantas de cultivo *in vitro* del subgrupo Cavendish cv. Valery, fueron mejoradas en invernadero con aislamientos endofíticos de *F. oxysporum* y *T. atroviridae* y luego llevadas a campo. Previo a la floración, las plantas inoculadas mostraron menores cantidades de *R. similis* y una mejor sanidad radical que las que no lo fueron, sobresaliendo *T. atroviridae*.

Dentro de este grupo de organismos “protectores” se considera además a las micorrizas vesículo-arbusculares del género *Glomus* (Ayuso 2002, Elsen, et al. 2007), principalmente.

Estudios realizados por Jaizme-Vega y Rodríguez-Romero (2004), encontraron que la inoculación dual de *G. mosseae* incrementó el desarrollo y la nutrición de vitroplantas de banano de la variedad *Musa acuminata* Colla cv. Gran Enano, respecto al testigo no inoculado en condiciones de invernadero. En experimentos contra *M. incognita* y *Pratylenchus goodeyi*, la inoculación de vitroplantas con *G. mosseae* y un coctel de bacterias (*Bacillus* spp), resultó en menores índices de reproducción de los dos nematodos y en un menor número de nódulos radicales provocados por *M. incognita*. Por su parte, Elsen et al. (2007) informan por primera vez, los mecanismos de resistencia sistémica inducida por *G. intraradices*.

Gómez y Rojas (2008), en condiciones de vivero con vitroplantas de plátano (*Musa* AAB, cv Curraré), encontraron mejores índices de crecimiento y niveles de reproducción de *R. similis* menores en plantas inoculadas con *Glomus manihotis* y *Gigaspora ramidospora*, solo o en mezcla, respecto a los controles absoluto e inoculado con el nematodo.

Los posibles mecanismos de acción mediante los cuales los hongos endofíticos regulan las poblaciones de los nematodos son puntualizados por Sikora y Pocasangre (2004) y se refieren a: a) parasitismo o patogenicidad a nematodos o huevos; b) supresión del desarrollo de los nematodos o de la fertilidad; c) inhibición de la movilidad; d) interferencia a la atracción o reconocimiento; e) inhibición de la penetración; f) actividad repelente; g) resistencia inducida; y h) promoción de crecimiento de la planta y tolerancia inducida. Según los autores, el gran espectro de formas de actividad indica que los inoculantes compuestos por varios aislamientos, pueden ser más eficaces para producir niveles de control más altos y a más largo plazo.

Estudios más recientes señalan que el mecanismo de acción de los organismos endofíticos, está más enfocado hacia la competencia por nutrientes en los tejidos internos de la raíz (endorriza) y hacia la resistencia sistémica inducida, que hacia efectos parasíticos (Sikora et al. 2008).

En estudios realizados por Hallmann y Sikora (1996), la aplicación de filtrados crudos de 13 aislamientos de hongos endofíticos produjeron metabolitos secundarios altamente tóxicos a juveniles *M. incognita*, obteniendo distintos niveles de parálisis y de mortalidad de acuerdo al tiempo de exposición; en el mismo estudio, estos filtrados fueron menos efectivos hacia *R. similis* y *Pratylenchus*, y totalmente inocuos a especies no parasíticas. Adicionalmente, se menciona en este estudio, la actividad repelente de algunos aislamientos, lo cual se debe a la producción de sustancias tóxicas previamente observadas en condiciones de laboratorio. Otro mecanismo de supresión a nematodos es a través de la resistencia sistémica inducida.

Se sugiere que debido a los altos costos que representa el escalamiento y la aplicación inundativa de agentes de combate biológico de nematodos en 2.500 TM de suelo por hectárea (volumen de suelo estimado a 25 cm de profundidad en donde se encuentra la mayoría de las raíces), el uso de esta técnica de mejoramiento biológico, representa importantes ahorros en el costo de control de los nematodos, dado que la inoculación se realiza únicamente a las vitroplantas (Sikora et al. 2008; zum Felde et al. 2009).

Sin embargo, trasladar los beneficios del mejoramiento biológico al campo tiene sus limitantes debido al lento crecimiento y colonización del simbiote (endófito) en la patozona y a que algunos de los candidatos son parásitos obligados, muy difíciles de reproducir comercialmente en altas densidades a bajo costo (Sikora et al. 2008).

El descubrimiento de la “protección cruzada” contra la pudrición por *Fusarium oxysporum* (Mal de Panamá), mediante la inoculación de cepas no patógenicas

del mismo hongo, alienta a continuar desarrollando la técnica del mejoramiento biológico (Sikora et al. 2008).

2.5.3 Enmiendas orgánicas y otras alternativas.

La aplicación de enmiendas orgánicas al suelo es vista como una estrategia de disposición de residuos ambientalmente favorable y también tiene un efecto positivo en la salud del suelo. De acuerdo a Pattison et al. (2011), parte de estas atribuciones resultan de la mejora en las propiedades físicas (retención de humedad, porosidad y densidad aparente), químicas (pH, conductividad eléctrica y contenido nutricional) y biológicas (población microbial). Es también conocido que la aplicación de estos materiales regula las poblaciones de los patógenos del suelo, incluyendo a los fitonematodos, lo cual es un soporte para que los productores puedan reducir el uso de nematicidas (Oka 2010).

Se ha demostrado que la biodiversidad en el suelo se ve afectada negativamente por la reducción en el contenido de materia orgánica y por la baja densidad de plantas que prevalece en un monocultivo (Vilich y Sikora 1998). Por esta razón, la incorporación de enmiendas orgánicas, al incrementar los niveles de materia orgánica, podría resultar en la reducción de las poblaciones de nematodos fitoparásitos.

A nivel de finca comercial, Ayuso (2002), aplicando 21, 6 TM ha⁻¹ año⁻¹ de compost, gallinaza y bocashi, con y sin la inoculación del hongo micorrícico *Glomus* sp a razón de 10g planta⁻¹ mes⁻¹, encontró a lo largo de un año de evaluaciones, que las enmiendas orgánicas tuvieron efectos significativos sobre la población de *R. similis* a partir del sexto mes y hasta la conclusión del experimento, siendo la gallinaza y el compost en ese orden, los más eficaces (sin diferir estadísticamente), incluso sobre el tratamiento químico con tres diferentes moléculas nematicidas aplicadas en rotación. No se encontró un

efecto positivo de la aplicación de la micorriza sola o en mezcla con las enmiendas.

La gallinaza ha mostrado también efectos positivos en la reducción de la densidad de *R. similis*, *M. incognita*, *Rotylenchulus reniformis* y *Helicotylenchus multincinctus*. En un estudio realizado en Puerto Rico en una plantación de plátano aplicando gallinaza a razón 7,3 kg y 14,5 kg planta⁻¹, se encontró densidades poblacionales de estos nematodos significativamente menores en comparación con el tratamiento químico con fenamiphos (1,5g de ingrediente activo planta⁻¹); asimismo, se encontró un mejor desarrollo, condición radical y cosecha con la enmienda aplicada (Chavarría-Carvajal et al. 2006).

Pattison et al. (2011), luego de evaluar a nivel de vivero con plantas de banano, el efecto de 9 tipos de materiales orgánicos en tres tipos de suelo, determinó que aquellos que contenían cantidades altas carbono (paja de pasto, paja de plantas leguminosas y lodos de molinaje), redujeron significativamente las poblaciones de *R. similis*, respecto a las plantas que no fueron tratadas con las enmiendas. Además, encontró un mayor peso seco de la parte aérea de la planta con los residuos de banano y los lodos. Debido a que no se encontró un mecanismo que explicara el control de la población de nematodos, se asumió que esto se debió a una supresión general del suelo, principalmente debido a: a) la modificación de las propiedades biológicas del suelo; b) el incremento de las poblaciones de bacterias y hongos con actividad antagonista a los nematodos; c) la prevención de la penetración de los nematodos a la raíz; d) la reducción de su reproducción una vez que entraron; e) el incremento en el número de nematodos omnívoros; f) el efecto de metabolitos generados a partir de la descomposición de la materia orgánica; y, g) a través de cambios en la composición de la cadena trófica del suelo.

Similarmente, Tabarant et al. (2011), encontraron efectos positivos producto de la adición de diferentes enmiendas (bagazo y residuos de caña de azúcar, lodos del depurado y de la refinería del azúcar), tanto en el crecimiento de plantas de

banano Cavendish cv. Grande Naine, como en disminución de la densidad de *Pratylenchus coffeae*, *Rotylenchulus reniformis* y *Meloidogyne* spp a nivel de la raíz. Este mejor crecimiento de las plantas fue explicado en parte por la liberación de nitrógeno a partir de las enmiendas y por un menor nivel de daño a la raíz, lo cual estuvo a su vez relacionado al control de los nematodos. Los lodos de la depuración aportaron las mayores cantidades de nitrógeno mineral. Por otra parte, todas las enmiendas produjeron diferentes niveles de control, posiblemente por la adición de material orgánico rico en lignina y celulosa, que son ricas fuentes de carbono aprovechables por diferentes tipos de hongos que pudieron participar en la promoción del crecimiento vegetativo y en el control de los nematodos mediante diferentes mecanismos.

Una de las desventajas de usar enmiendas orgánicas como método de control de fitonematodos, es la inconsistencia en el control que estas pueden aportar, lo cual está altamente influenciado por el tipo de enmienda. Es por esta razón que el entendimiento de los mecanismos mediante los cuales se produce la supresión en suelos enmendados, es esencial para mejorar este método y obtener la mejor eficacia de su implementación (Oka 2010).

Específicamente el efecto de las enmiendas, puede explicarse a través de: a) la liberación de fitoquímicos con efecto nematicida, por parte de enmiendas hechas a base de residuos de plantas como el neem (*Azadirachta indica*), asteráceas (*Tagetes* spp), *Artemisia dracunculus* y *Crotalaria* spp, entre otras; b) por la generación de compuestos con efecto nematicida durante el proceso de degradación de las enmiendas, como es el caso de los derivados del glucosinato y ácidos orgánicos (acético, butírico, fórmico y propiónico); c) por el efecto de compuestos nitrogenados como el amonio, generados a partir de la fermentación de enmiendas con una baja relación carbono-nitrógeno (C/N), como es el caso de los estiércoles animales y de residuos provenientes de la industria de aceites vegetales (tortas), cárnica (huesos, cachos y sangre), avícola (plumas) y pesquera (concha de cangrejo); y, d) por la liberación de

compuestos derivados de la glicosida, liberados por enmiendas verdes de algunos pastos (pasto Sudán, sorgo) que contienen glicosidos cianogénicos, que se transforman en el suelo generando ácido cianídrico (HCN), que posee efecto nematicida (Oka 2010).

Desde el punto de vista biológico, los niveles de antagonismo hacia los nematodos son el resultado de múltiples factores: a) el incremento de microorganismos no antagonistas como los nematodos de vida libre (bacteriófagos y fungívoros), que compiten con los fitonemátodos por nichos ecológicos; b) el establecimiento de una mayor variedad y cantidad de organismos antagónicos, como los hongos nematófagos (atrapadores y parasíticos de huevos y de estados juveniles), bacterias y nematodos depredadores (Oka 2010).

3. METODOLOGÍA

3.1 Tipo de Investigación.

La investigación es exploratoria, porque a partir de una colección de aislamientos bacterianos relacionados al género *Bacillus* obtenidos de un suelo caracterizado como supresivo a *Radopholus similis*, y de un proceso dirigido a caracterizar y seleccionar los candidatos más representativos de dicha colección, busca determinar el potencial de los diferentes morfotipos para reducir la infección y la reproducción del nematodo en la raíz, y a la vez, para estimular el crecimiento vegetativo de plantas de banano, bajo condiciones de vivero.

Como base científica que apoya esta hipótesis, se tiene un número importante de investigaciones que reportan el potencial del género *Bacillus*, como agente de control de nematodos fitoparásitos (incluyendo a *R. similis*), y un estudio previo de caracterización molecular de los principales taxones presentes en el suelo supresivo, el cual demuestra una mayor diversidad y abundancia de bacterias relacionadas al género, *Bacillus*, respecto a un suelo conducivo aledaño.

3.2 Método de investigación

El método de investigación a utilizar en este estudio es cuantitativo. Según Sarduy (2007), este método se dedica a recoger, procesar y analizar datos cuantitativos o numéricos sobre variables previamente determinadas. Dichos datos deberán estar en total consonancia con variables determinadas. La investigación cuantitativa estudia además la asociación o relación entre las variables que han sido cuantificadas, lo cual ayuda a interpretar los resultados.

En la presente investigación, las variables de estudio seleccionadas se dividen en dos grupos: las variables provenientes de la caracterización cultural y celular (morfología, origen de la muestra, respuesta a tinción de Gram e identificación

molecular), y las variables provenientes del experimento en vivero con plantas de banano (cantidad de nematodos y crecimiento vegetativo).

Se espera que la información generada sea de mucha utilidad para establecer un protocolo para la preselección de candidatos de acuerdo a sus características morfológicas, y para evaluar con mayor eficiencia bajo condiciones de vivero, la actividad promotora de crecimiento y reguladora de los nematodos, a efecto de seleccionar a los candidatos con mejores condiciones para ser validados en estudios posteriores a nivel de campo.

3.3 Ubicación espacial y temporal.

El experimento se realizó en las instalaciones del Centro de Control Biológico y Biología Molecular y en el vivero de la Sección de Nematología de la Dirección de Investigaciones Agrícolas, pertenecientes a 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 (figura 5).

El período experimental fue de abril de 2013 a febrero de 2014. De acuerdo a BANACLIMA, la estación Climatológica de La Rita registró en promedio por semana para el período experimental, una temperatura media de 24,9°C, una humedad relativa del 88,9%, una radiación solar de 331,54 W/m² y una precipitación de 42,4 mm (932 mm acumulados). El anexo 1 muestra los datos de las variables climatológicas por semana.



Figura 5. Fotografía satelital mostrando las instalaciones del Centro de Control Biológico y el vivero de la sección de nematología.

Fuente: Google Earth (<http://maps.google.es/maps>) y propia del autor.

3.4 Instrumentos utilizados para la ejecución del proyecto.

Para cada una de las etapas del proyecto (muestreo, procesamiento de las muestras en laboratorio y experimento de vivero), la figura 6 muestra las herramientas y utensilios, los materiales (consumibles) y los equipos que se utilizaron.

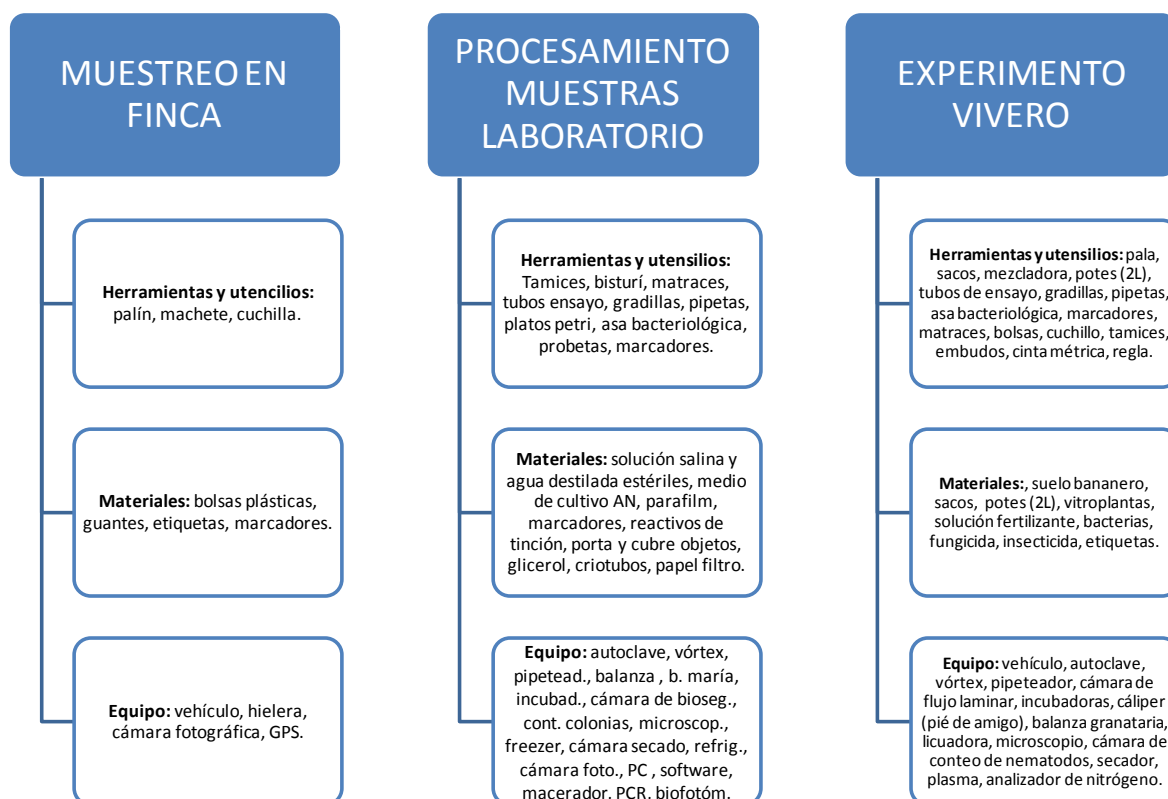


Figura 6. Instrumentos, materiales y equipos utilizados en la investigación.

Fuente: propia del autor.

3.5 Procedimiento.

3.5.1 Muestreo y caracterización del área supresiva.

Las muestras fueron tomadas en el mes de abril de 2013, en una finca bananera comercial ubicada en el cantón de Guácimo, provincia de Limón, a 40 metros sobre el nivel del mar (msnm). El material de siembra presente en dicha sección pertenece al subgrupo Cavendish, clon Valery y la plantación tenía 20 años de antigüedad. La figura 7 muestra la ubicación geográfica y las características de la sección de la finca de donde se tomaron las muestras.

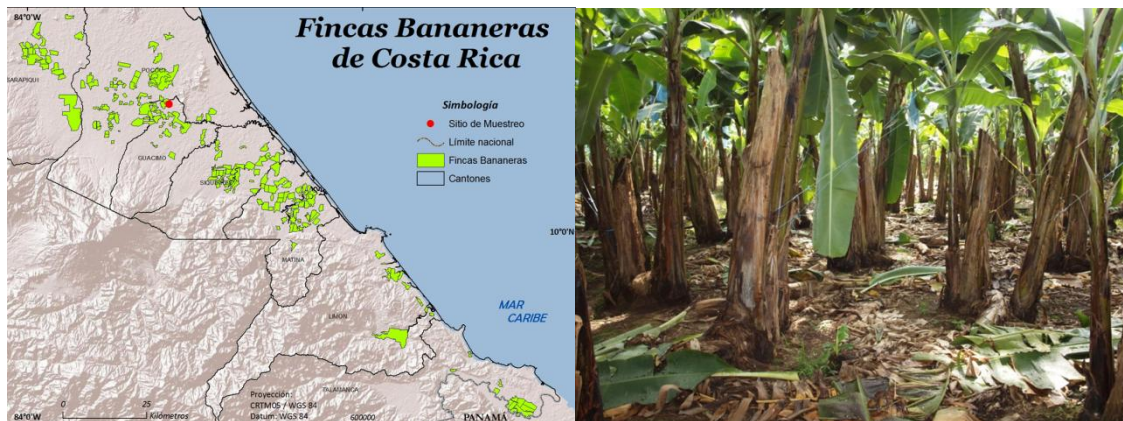


Figura 7. Ubicación geográfica y condiciones generales de la plantación.

Fuente: propia del autor.

Dicha sección de aproximadamente 3 000m² de superficie, fue previamente seleccionada debido a que a través de muestreos realizados a lo largo de los años, se ha comprobado consistentemente, niveles bajos de nematodos totales y del nematodo barrenador, *Radopholus similis* en las raíces de las plantas, en comparación con otras secciones aledañas de la finca (Vargas *et al.* 2012).

Utilizando unidades de producción (UP) con plantas madre recién florecidas, con la ayuda de un palín se hizo un hoyo de 15 x 15 x 30 cm (6.750 cm³), frente al hijo de sucesión, a 10 cm de su base. A partir de este punto se extrajo raíz funcional (RF), suelo rizosférico (SR), definido como el suelo contenido a una distancia máxima de 3 mm a partir de la epidermis radicular, y suelo extrarizosférico (SER), definido como el suelo más allá del rizosférico. La figura 8 muestra las características del punto de muestreo y los diferentes tipos de muestra recolectados.



Figura 8. Ubicación del punto de muestreo frente al hijo de sucesión (izquierda) y tipos de muestra recolectados (derecha).

Fuente: propia del autor.

Utilizando una distribución aleatoria, se extrajo un total de 15 muestras de cada tipo (figura 9). Los puntos de muestreo fueron georreferenciados y las muestras extraídas se introdujeron individualmente en bolsas plásticas, se rotularon y se transportaron en una hielera, hasta el Laboratorio de Control Biológico de CORBANA, para su procesamiento.

Con el objeto de tener una referencia de las condiciones nematológicas de la raíz y de los contenidos químicos y microbiológicos del suelo en el sitio de muestreo, parte de las muestras fueron analizadas en los laboratorios de Nematología, Análisis Químico y Control Biológico de CORBANA. Para la extracción y cuantificación de los nematodos se utilizó la metodología descrita por Speijer y de Waele (1997). Para determinar el contenido macro y micro elementos, pH, acidez intercambiable y contenido de materia orgánica, se utilizaron las metodologías descritas por Nelson y Sommers 1982, Thomas 1982, Mehlich 1984 y AOAC 2000. Para el análisis microbiológico se utilizó la metodología de CORBANA, descrita en el Anexo 2, el cual se basa en el

recuento viable mediante la cuantificación de las unidades formadoras de colonia (UFC) de hongos, bacterias y actinomicetes totales.

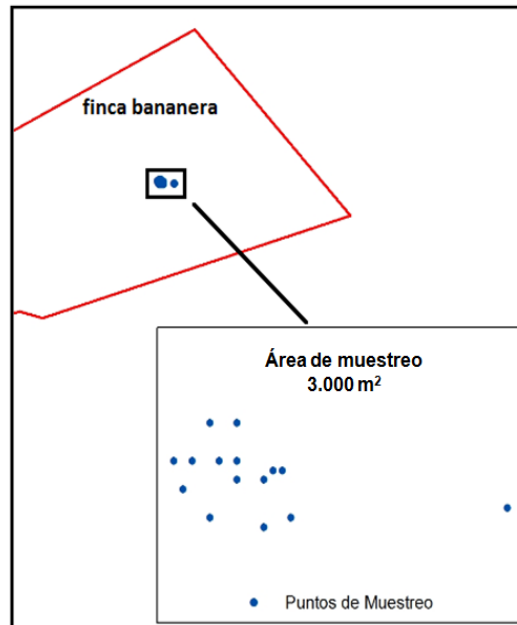


Figura 9. Distribución y ubicación de los puntos de muestreo.

Fuente: propia del autor.

3.5.2 Procesamiento de las muestras y obtención de los aislamientos bacterianos.

Una vez en el laboratorio, las muestras de suelo se homogenizaron y las muestras de raíz se lavaron con abundante agua de tubo y se pusieron a secar sobre toallas de papel a temperatura ambiente por espacio de una hora.

Para el aislamiento de bacterias esporuladas (relacionadas al género *Bacillus*) presentes en el suelo (SR y SER), se preparó una suspensión madre (SM) mezclando 10 g de suelo con 90 ml de solución salina estéril (SSE). La suspensión se agitó manualmente por espacio de un minuto y a continuación, se diluyó en base 10 (10^{-1}), agregando 1 ml de la SM en un tubo de ensayo de 25 ml de capacidad conteniendo 9ml de SSE.

Para el aislamiento de bacterias endófitas presentes en el tejido radical, a partir de la muestra se seleccionaron 5 trozos de raíz funcional de no menos de 0,2 mm de diámetro y de una longitud aproximada a los 2 cm.

Bajo condiciones de asepsia, utilizando una cámara de flujo laminar, las muestras se desinfectaron sumergiéndolas primero en alcohol (70°), por espacio de un minuto y posteriormente, en una solución de hipoclorito de Sodio (NaClO) al 3%, por espacio de 3 minutos. Para eliminar el desinfectante, la raíz se lavó tres veces en agua destilada estéril (ADE), en períodos de dos minutos cada vez.

Para preparar la suspensión madre, la raíz seleccionada y desinfectada de cada muestra, se introdujo en un tubo de ensayo de 25ml de capacidad, conteniendo 10ml de SSE y con la ayuda de un policia de vidrio, la muestra se maceró y dejó en reposo por espacio de una hora. Posteriormente, la muestra se diluyó en SSE hasta 10^{-1} , de la misma forma que se indicó para las muestras de suelo.

En ambos casos (suelos y raíz) y con el objeto de eliminar bacterias no esporuladas, las muestras se pasteurizaron a 65°C utilizando un baño maría por espacio de 30 minutos y posteriormente, se sometieron a un choque térmico a 0°C por espacio de otros 30 minutos.

Las muestras así tratadas se diluyeron hasta 10^{-6} y a continuación, 100µL de las diluciones 10^{-5} y 10^{-6} , se inocularon por duplicado en medio de cultivo agar nutritivo (AN), e incubaron a 30°C en completa oscuridad por espacio de 2 días para obtener colonias de las diferentes bacterias presentes.

Del total de colonias presentes en los platos petri, se seleccionaron aquellas que estuvieran aisladas y que mostraran características diferentes, de tal forma que se tomaran en cuenta todos los morfotipos presentes. Las colonias seleccionadas se inocularon nuevamente en AN utilizando la técnica de rayado; luego del período de incubación, las colonias aisladas y puras se

preservaron en dos sistemas de conservación: crioconservación a -80°C y papel filtro. Ambos sistemas de conservación se explican en el anexo 3.

Finalmente, se determinó el número de aislamientos obtenidos a partir de cada tipo de muestra y su porcentaje respecto al total de aislamientos obtenido.

La figura 10 resume el procedimiento seguido para el procesamiento de las muestras, el aislamiento de los microorganismos y su conservación.

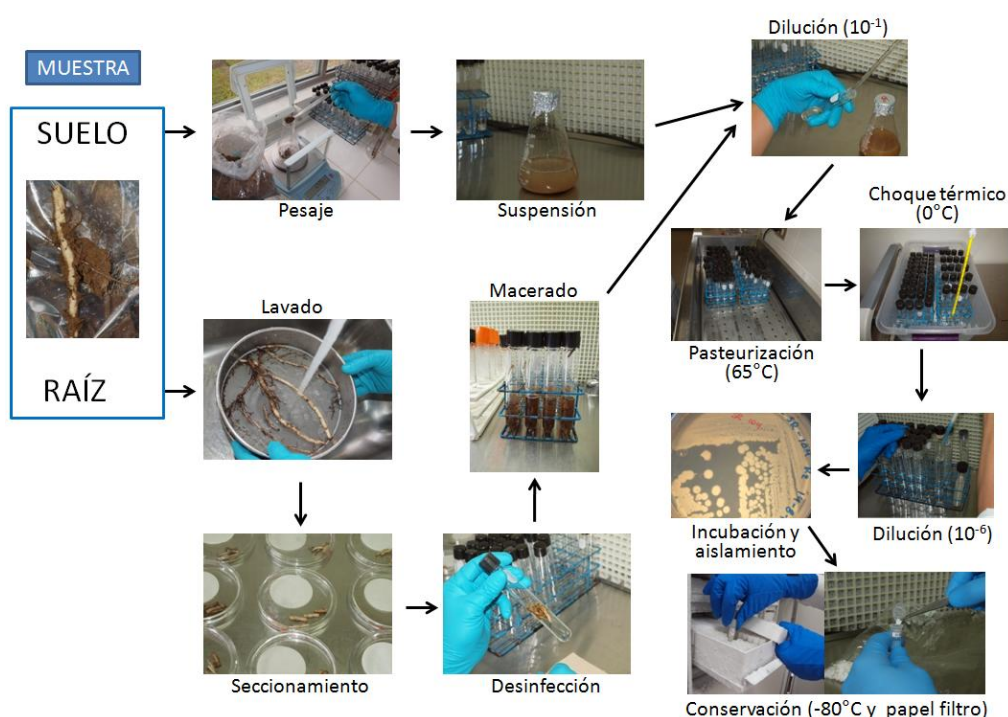


Figura 10. Procedimiento utilizado para la obtención de bacterias a partir de las muestras de suelo (rizosférico y extra rizosférico) y raíz.

Fuente: propia del autor.

3.5.3 Caracterización de los aislamientos y selección de candidatos.

Con el fin de obtener aislamientos frescos, a partir de cada una de las bacterias conservadas mediante crioconservación (-80°C), se cultivó dos veces

consecutivas en medio AN (la segunda vez por duplicado). Este segundo grupo de cultivos se dividió en dos partes: una mitad que se incubó por espacio de dos días y la otra, que se incubó por espacio de 5 días. En ambos casos se utilizó una temperatura de incubación de 30°C y oscuridad total.

La caracterización consideró dos niveles de estudio: a) descripción morfológica de las colonias bacterianas (denominada caracterización cultural), para la cual se utilizaron los cultivos de dos días de incubación y; b) descripción celular mediante tinción de Gram y tinción simple, para lo cual se utilizaron los cultivos de dos y 5 días de incubación, respectivamente. En el anexo 4 se detalla el procedimiento utilizado para realizar las tinciones.

La caracterización morfológica de las colonias incluyó la observación de 8 características (velocidad de crecimiento, forma, tamaño, color, tipo de borde, elevación, textura y otras características), las cuales a su vez incluyeron 40 variantes en total. La caracterización celular por su parte, incluyó la observación de 5 características (longitud, forma, grosor, ausencia de endóspora y forma de la endóspora), las cuales a su vez incluyeron en total a 14 variantes. El total de variantes estudiado fue por lo tanto de 54.

El cuadro 5 detalla las características que fueron analizadas y en el anexo 5 se incluye la ficha utilizada para recopilar los datos.

Para determinar la efectividad del protocolo de aislamiento implementado en cuanto a la obtención de aislamientos bacterianos relacionados al género *Bacillus* (bacterias Gram positivas, de forma bacilar y formadoras de endósporas), se calculó en términos absolutos y porcentuales, el número de aislamientos relacionados a dicho género, tanto respecto al total de aislamientos coleccionado, como respecto al tipo de muestra procesado.

Cuadro 5. Características culturales y celulares estudiadas.

COLONIA	
Carácterística	Variante
Velocidad de crecimiento	Alta Media Lenta
Forma	Circular Filamentosa Irregular Rizoide Fusiforme
Tamaño	Pequeña Mediana Grande
Color	Blanca Lechoza transparente Lechoza transparente ámbar Amarillo claro Amarilla Anaranjada
Borde	Liso Ondulado Lobulado Dentado Filamentoso
Elevación	Plana Elevada Convexa Pulvinada Umbilicada
Textura	Cremosa Pegajosa Dura
Otras características	Estrías grandes Estrías medianas Estrías pequeñas Rugosa Borde blanco Borde y centro blanco Borde tenue Nubosa Con filamento Lobuliza denso Lobuliza tenue
CÉLULA	
Carácterística	Variante
Longitud	Corta Mediana Larga
Forma	Bacilo Coco bacilo
Grosor	Delgada Mediana Gruesa
Endóspora	Ausente
Forma de endóspora	Alargada pequeña Alargada mediana Alargada grande Globulosa

Para analizar los datos provenientes de la caracterización cultural y celular de los aislamientos, se confeccionó una matriz binaria, asignando un “cero”, cuando la característica estuvo ausente, y un “uno”, cuando la característica estuvo presente. La matriz fue procesada utilizando el programa denominado TREECON[®] (Van de Peer y De Wachter, 1994); este programa permite generar dendrogramas, que a su vez están formados por grupos de microorganismos que comparten cierta similitud expresada en porcentaje.

Asimismo, con el objeto de seleccionar microorganismos con diferentes características coloniales y celulares, y de esta forma asegurar una alta representatividad de los aislamientos seleccionados, dentro del total de aislamientos coleccionados, se generó un total de 16 dendrogramas diferentes mediante la eliminación paulatina de algunas características que se consideraron menos robustas. El número de características contemplada inicialmente fue de 54, y el número final fue de 13.

Luego de haber generado los dendrogramas, los resultados se tabularon tomando únicamente tres niveles de agrupamiento mínimo: grupos de 3 ó más aislamientos por grupo (≥ 3), grupos de 4 ó más aislamientos por grupo (≥ 4) y grupos 5 ó más aislamientos por grupo (≥ 5), todos ellos compartiendo al menos el 50% de sus características. Grupos de cualquier tamaño pero compartiendo menos del 50% de sus características, así como grupos formados por dos aislamientos o aislamientos no incluidos dentro de ningún grupo, se descartaron del estudio, pero se tomaron en cuenta para determinar la representatividad de cada dendrograma.

Para cada dendrograma y nivel mínimo de agrupamiento, se estudió el número de aislamientos que cumplió con las características indicadas, respecto al total de aislamientos caracterizados, es decir, la representatividad (%) de cada dendrograma; adicionalmente se estudió el número promedio de aislamientos incluidos dentro de cada grupo, es decir, el tamaño promedio de los grupos. Lo anterior permitió seleccionar de una manera objetiva, el nivel mínimo de agrupamiento y continuar con el proceso de selección de los aislamientos.

Una vez seleccionado el nivel mínimo de agrupamiento, se estudió para cada uno de los 16 dendrogramas generados, el número de grupos formados, el tamaño promedio de cada grupo, el total de aislamientos incluido y su representatividad (%). Cumpliendo los criterios indicados, se seleccionó un dendrograma formado por 20 grupos, a partir del cual se seleccionó un total de 20 aislamientos (uno en promedio por grupo), para ser evaluados a nivel de vivero como posibles agentes de control de *Radopholus similis*.

3.5.4 Identificación molecular de los aislamientos seleccionados.

En primera instancia, cada aislamiento fue inoculado en medio de cultivo AN y sometido a un período de 3 días de incubación en completa oscuridad, a una temperatura constante de 30°. Una vez formadas las colonias y comprobada la pureza del cultivo, el material se llevó al Laboratorio de Biología Molecular de CORBANA donde se realizó la extracción de ácidos nucleicos totales, siguiendo el protocolo de Bandfass et al. 2008, modificado por CORBANA.

La amplificación de las secuencias genéticas se realizó mediante PCR utilizando los iniciadores específicos para *Bacillus* sp BacForward (AGGGTCATTGGAAACTGGG) y BacReverse (CGTGTTGTAGCCCAGGTCATA), de acuerdo a la metodología descrita por Kuske et al. 1998. La reacción se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: 2 min. a 94°C; 35 ciclos de un minuto a 55°C, un minuto a 72°C y 30 segundos a 94°C; un minuto a 55°C; y 5 min. a 72°C. Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1,5%. Los aislamientos que no amplificaron con los iniciadores específicos, se amplificaron con iniciadores generales para bacterias (P3MOD y PC5), siguiendo la metodología de Kuske et al. 1998. El producto de amplificación se envió a secuenciar a Macrogen Inc, ubicado en Seoul, Korea del Sur (<http://www.macrogen.com/eng/>).

Para analizar las secuencias obtenidas se utilizó el programa denominado BLAST (Altschul et al. 1997), mediante el cual se realizó una comparación con

las secuencias depositadas en la base de datos no depurada National Center for Biotechnology Information (NCBI). El análisis se completó comparando las secuencias con la base de datos Ribosomal Database Project (RDP), la cual es depurada y específica para bacterias.

Posteriormente, se realizó un análisis de agrupamiento utilizando el método denominado Unweighted-Pair Group Method with Arithmetic Means (UPGMA), para lo cual se utilizó el programa Mega 5.10 (Tamura et al. 2011). Este método generó un árbol de distancias genéticas que sirvió para determinar la afinidad genética entre las bacterias incluidas dentro de un grupo, la afinidad entre los grupos de bacterias formados.

3.5.5 Experimentación en vivero con plantas de banano.

3.5.5.1 Suelo utilizado y descripción de la unidad experimental.

El suelo utilizado para la siembra de las plantas fue extraído de una plantación bananera ubicada en el cantón de Pococí, distrito La Teresa, caracterizada como de alta infestación con nematodos.

Previo a la siembra de las plantas, el suelo fue homogenizado y analizado en cuanto al número y especie de nematodos presentes en el suelo, contenido microbiológico y contenido químico. Para la extracción y cuantificación de los nematodos se utilizó la técnica desarrollada por Christie y Perry (1951), la cual se describe en Esquivel y Peraza 2010. Para los análisis microbiológicos se utilizó la metodología descrita en el anexo 2, y para el análisis químico, las metodologías descritas por Nelson y Sommers 1982, Thomas 1982, Mehlich 1984 y AOAC 2000.

La unidad experimental consistió de una planta de banano (*Musa* AAA), subgrupo Cavendish, cv. Grande Naine, en fase IV, reproducida mediante cultivo de tejidos, la cual se sembró en una maceta plástica de 1,8 L de capacidad (figura 11).



Figura 11. Vitroplantas del clon Grande Naine en fase IV (izquierda) y unidad experimental (derecha).

Fuente: propia del autor.

3.5.5.2 Producción de inóculo y estandarización de la concentración.

El inóculo de cada aislamiento se obtuvo a partir de la réplica de la colección de bacterias conservada en discos de papel filtro. Bajo condiciones de asepsia y con la ayuda de un asa micológica, un disco de cada aislamiento bacteriano conteniendo endósporas, se frotó sobre la superficie de medio AN contenido en platos petri. Los platos petri se incubaron a 30°C por 48 horas en total oscuridad, hasta obtener colonias de las bacterias. El procedimiento descrito se repitió y los cultivos resultantes se utilizaron como inóculo para la etapa de vivero.

Para obtener el inóculo necesario para el experimento de vivero, bajo condiciones de asepsia, las colonias provenientes de 6 platos petri de cada bacteria, se cosecharon con la ayuda de una espátula, y se adicionaron a un tubo de ensayo de 100ml de capacidad, conteniendo 30 ml de SSE (0,85% p/v) para obtener así la suspensión bacteriana. La suspensión fue vigorosamente homogenizada mediante agitación en un vórtex por espacio de un minuto y utilizando una micropipeta, se adicionó gota a gota, a un tubo de ensayo

conteniendo 60 ml de SSE, hasta equiparar la turbidez del patrón 0,5 de la Escala de Mc Farland (anexo 6), correspondiente a una concentración de $1,5 \times 10^8$ UFC de *Escherichia coli*.

Para estandarizar la concentración de cada bacteria, se cuantificó el volumen de la suspensión que fue necesario para equiparar al patrón 0,5 de Mc Farland. La figura 12 muestra el proceso de producción de inóculo y estandarización de la concentración de bacterias.

Asimismo, para cuantificar la concentración de cada aislamiento a evaluar, se realizó un recuento de unidades formadoras de colonia (UFC), utilizando la metodología para muestras líquidas descrita en el anexo 2. Los datos resultantes se expresaron en UFC/ml de la suspensión equiparada al patrón de turbidez 0,5 de la escala de Mc Farland.

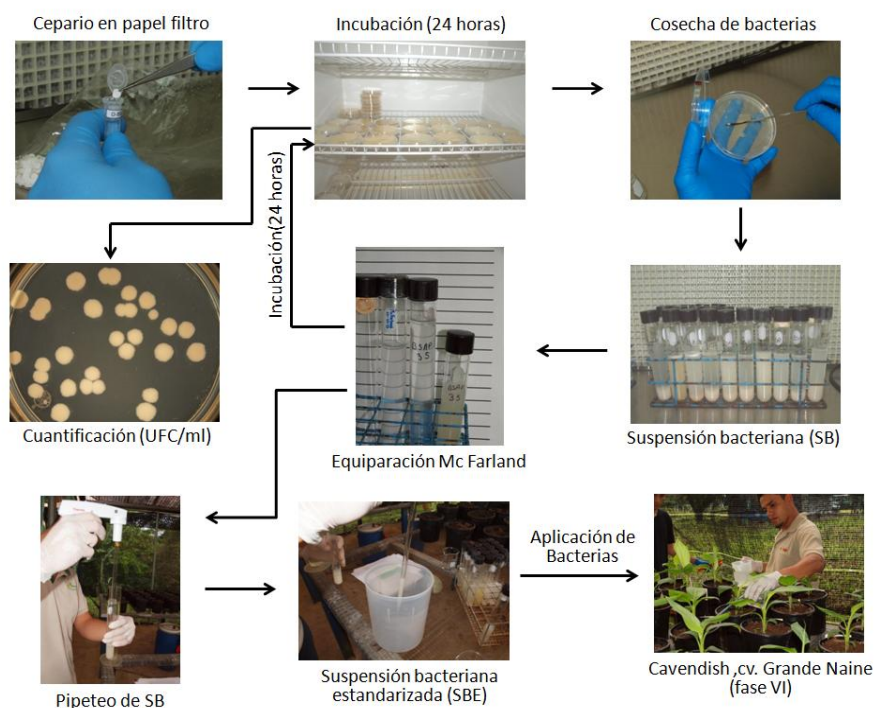


Figura 12. Producción de inóculo bacteriano y estandarización de la concentración de cada bacteria.

Fuente: propia del autor.

3.5.5.3 Inoculación de las bacterias y nematodos.

Se realizaron cuatro aplicaciones de cada una de las bacterias seleccionadas, dos de ellas de forma previa a la inoculación de los nematodos (efecto preventivo), y dos posteriores a ello (efecto curativo). La inoculación de los nematodos (*R. similis*) se realizó con el objeto de asegurar una homogénea y alta infestación de la raíz de las plantas.

La primera aplicación preventiva de las bacterias se realizó al momento del trasplante de las plantas a las macetas, es decir a los “cero” días después de la siembra (0 dds). Para ello se sumergió su sistema radical en un recipiente conteniendo un litro de la suspensión estandarizada, por espacio de 5 minutos (figura 13); posterior a esto, las plantas se sembraron en las macetas.



Figura 13. Primera inoculación preventiva de bacterias mediante la inmersión del sistema radical.

Fuente: propia del autor.

La segunda aplicación preventiva se realizó a los 15 DDS, mediante la aplicación de 100 ml de la suspensión estandarizada en cada maceta. La tercera y cuarta aplicación de las bacterias se realizó a los 49 y 63 DDS,

respectivamente, aplicando igual volumen de la suspensión estandarizada en cada maceta (figura 14).



Figura 14. Inoculación de bacterias mediante “drench” (100 ml).

Fuente: propia del autor.

La inoculación de los nematodos (*R. similis*) se realizó en forma de “drench”, aplicando 100ml por pote de una suspensión conteniendo en promedio 506 individuos (figura 15).

Los nematodos inoculados fueron provistos por el laboratorio de Nematología de CORBANA. Estas colonias fueron reproducidas utilizando la técnica con discos de zanahoria descrita por Speijer y de Waele (1997).



Figura 15. Inoculación de nematodos mediante “drench”.

Fuente: propia del autor.

Se incluyeron dentro del experimento un testigo químico o comercial que consistió en una única aplicación del nematicida oxamyl (Vydate® Azul 24SL) a los 63 DDS, a una concentración al 10% (v/v) de producto comercial, a razón de 100ml/maceta; un testigo absoluto sin nematodos y sin aplicación de agentes de control y un testigo inoculado con nematodos, pero sin la aplicación de agentes de control (TESTNEMA), el cual se utilizó para comparar el efecto de los tratamientos. Los tratamientos a evaluar se muestran en el cuadro 6.

Cuadro 6. Tratamientos utilizados en el experimento.

TRATAMIENTO°	CÓDIGO*
1	SER-35
2	SR-23
3	R-15B
4	SER-132
5	SER-246
6	SER-173
7	SER-26
8	SR-05
9	SER-217
10	SER-23
11	R-13
12	SER-25
13	SR-62
14	SER-80
15	SER-10
16	SR-87
17	SER-222
18	Bacillus sp (B-72)
19	SER-106
20	SR-12
21	TEST. COMERCIAL
22	TEST. ABSOLUTO.
23	TEST.NEMATODOS

*SER: suelo extrarizosférico. SR: suelo rizosférico. R: raíz

Adicionalmente, como forma de dar seguimiento al desarrollo de las poblaciones de nematodos (originales e inoculadas) que podrían estar presentándose, se contó con un grupo de 20 plantas no integradas dentro de diseño experimental, pero de idénticas características.

El primer grupo de 10 plantas se utilizó para conocer la cantidad de nematodos en 100g de raíz presentes hasta el día previo a la inoculación de los nematodos (34 DDS). Esta población correspondió a la progenie derivada de los nematodos originalmente presentes en el suelo que se utilizó para sembrar las plantas. El segundo grupo de 10 plantas se utilizó para conocer la cantidad de nematodos derivados de la progenie original y de la progenie de los nematodos inoculados. Este segundo grupo de plantas se analizaron el día previo a la aplicación de Vydate® (63 DDS).

3.5.5.4 Labores de mantenimiento de las plantas.

Todas las plantas tuvieron una fertilización base mediante la aplicación de 100 ml por pote de la solución completa de Hoagland, de acuerdo a lo indicado por Hershey (1994); esta se realizó en promedio una vez por semana.

Para evitar la quema del follaje por la acción del hongo *Mycosphaerella fijiensis*, causante de la enfermedad denominada Sigatoka negra, a partir del día 13 DDS, se asperjó semanalmente el fungicida mancozeb a una concentración al 1% de producto comercial (Dithane). Asimismo, debido a la aparición de áfidos en algunas de las plantas, fue necesaria la aplicación del insecticida Diazinón (63 dds) a una concentración al 1% de producto comercial, únicamente a las plantas afectadas.

Para hidratar las plantas se utilizó agua del tubo, la cual previo a ser aplicada, se almacenó en un estañón sin tapa por al menos por 48 horas para procurar la liberación del cloro y evitar que este afectara a las bacterias. Esta labor se realizó como mínimo dos veces por semana, aplicando entre 150 y 200 ml, según las condiciones climatológicas.

Durante el período experimental, todas las hojas senescentes y necrosadas, así como los hijuelos, se seccionaron de las plantas. El cuadro 7 muestra el programa seguido en cuanto a la aplicación de los tratamientos y en cuanto a las labores de mantenimiento del experimento.

Cuadro 7. Cronograma de actividades de mantenimiento del experimento.

ACTIVIDAD	03-dic	11-dic	16-dic	18-dic	20-dic	25-dic	30-dic	01-ene	03-ene	06-ene	08-ene	10-ene	16-ene	17-ene	21-ene	22-ene	24-ene	29-ene	30-ene	04-feb	05-feb	07-feb	12-feb	14-feb	19-feb
Siembra	X																								
Aplicación de bacterias 1	X			X											X					X					
Hoagland		X			X	X		X	X		X	X				X	X				X		X		
Dithane			X				X					X	X			X	X					X		X	
Inoculación de nematodos									X																
Aplicación de Vydate																					X				
Aplicación Diazinon (áfidos)																					X				
Cosecha																									X
DDS	0	8	13	15	17	22	27	29	31	34	36	38	44	45	49	50	52	57	58	63	64	66	70	72	77

3.5.6 Diseño experimental y variables a evaluar.

Se utilizó un diseño irrestricto al azar, con 10 repeticiones por cada tratamiento. La figura 16 muestra las condiciones del vivero y la distribución de las unidades experimentales.



Figura 16. Condiciones del vivero y distribución de las unidades experimentales.

Fuente: propia del autor.

La cosecha se realizó a los 77 DDS y las variables evaluadas fueron: el número de hojas presentes a la cosecha; la altura de la planta (cm); el diámetro de la base del pseudotallo (cm); el peso fresco de raíz y cormo (g); el peso fresco y seco (g) de la parte aérea de la planta (pseudotallo y el follaje); el contenido de nematodos (*Radopholus similis*, *Helicotylenchus sp*, *Pratylenchus sp* y *Meloidogyne sp*) por 100g de raíz. Adicionalmente se evaluó y el contenido de elementos químicos de la parte aérea de la planta. Las figuras 17 y 18 ilustran la medición de las variables de crecimiento.



Figura 17. Diámetro del pseudotallo (izquierda) y altura y número de hojas (derecha).

Fuente: propia del autor.

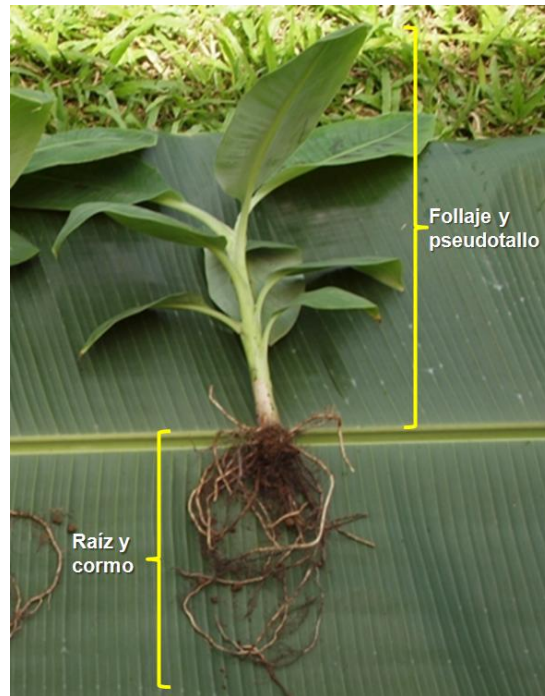


Figura 18. Peso fresco de raíz - cormo y de follaje y pseudotallo.

Fuente: propia del autor.

La extracción y cuantificación de los nematodos se realizó en el laboratorio de Nematología de CORBANA, utilizando la metodología descrita por en el Speijer y de Waele (1997).

Para obtener el peso seco del follaje y pseudotallo, el material se seccionó y luego se introdujo en bolsas de papel de 2 lbs de capacidad; las bolsas se rotularon y se introdujeron en un horno de secado por 48 horas a 75°C. Una vez secado y pesado el material, las muestras se ordenaron de menor a mayor peso y se seleccionó sistemáticamente la tercera, sexta y novena muestra, con el objeto de analizarlas en cuanto al contenido de elementos químicos mayores y menores. Esto se realizó con el objeto de observar posibles diferencias en los contenidos dependiendo del aislamiento aplicado y explicar posibles efectos en las variables de crecimiento. Este análisis se realizó en el Laboratorio de Análisis Químico de CORBANA siguiendo la metodología descrita por Sparks (1996).

Una vez cosechado el experimento, el suelo de cada tratamiento (10 macetas) se unió y homogenizó con el objeto de obtener una muestra representativa de cada aislamiento para analizar el contenido de bacterias, actinomicetes y hongos totales, así como el contenido de elementos químicos. Este análisis se realizó en el laboratorio de Control Biológico, siguiendo el procedimiento indicado en el anexo 2, y en el laboratorio de Análisis Químico, siguiendo la metodología descrita por Nelson y Sommers (1982), Thomas (1982), Mehlich (1984) y AOAC (2000).

3.5.7 Análisis de los datos.

Para las variables de crecimiento se aplicó un análisis de varianza (prueba de F para variables medibles) con el objeto de determinar la existencia de diferencias estadísticas entre los tratamientos aplicados. Cuando estas fueron encontradas, se realizó un agrupamiento mediante la prueba de Dunnett de cola superior, a efecto de identificar a los tratamientos que aumentaron el crecimiento respecto a TESTNEMA.

Para analizar el número de nematodos en 100g de raíz y determinar si hubo diferencias significativas entre los tratamientos, los datos primero se transformaron mediante logaritmo natural (LN) y luego se les aplicó un modelo lineal generalizado; a los residuos se les aplicó un modelo probabilístico binomial negativo. La prueba estadística usada fue la de Chi-cuadrado. Cuando fueron encontradas, se realizó un agrupamiento mediante la prueba de Dunnett de cola inferior, a efecto de determinar cuáles tratamientos redujeron la densidad de nematodos en las raíces respecto a TESTNEMA.

El análisis se realizó mediante procedimientos GLM y GenMod de SAS (SAS Institute Inc. 2008).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización nematológica, química y microbiológica del suelo en el área supresiva muestreada.

El cuadro 8 muestra la condición radical y el contenido de nematodos promedio en la raíz, tanto del área supresiva a partir de la cual se aislaron las bacterias, como de un área adyacente caracterizada como conduciva, la cual sirvió como parámetro de comparación.

Se observa que aunque no se presentaron diferencias en cuanto al peso de raíz funcional, raíz no funcional y raíz total, sí las hubo en cuanto a la cantidad promedio de *Radopholus similis* y nematodos totales, siendo estas en promedio (n=2) de 27 200 y 32 800 para el área conduciva, y de 1 400 y 10 000, para el área supresiva, respectivamente.

Lo anterior indica que el área supresiva mostró un 94,9% menos *R. similis* y un 69,5% menos nematodos totales, respecto al área conduciva, lo cual confirma la condición de supresividad del área a partir de la cual se extrajeron las muestras. Asimismo, en el área supresiva, *Helicotylenchus* sp representó el 62,0% del total de nematodos, y en el área conduciva, *R. similis* representó en 82,9%.

Por el contrario, en el área conduciva no se detectó la presencia de *Meloidogyne* sp ni de *Pratylenchus* sp, cuyas cantidades promedio alcanzaron los 1 600 en el área supresiva. Los bajos niveles de estas dos especies no necesariamente responden a una condición de supresividad, sino a que su presencia frente a *R. similis* y a *Helicotylenchus* sp es a menudo mucho menor.

Los datos anteriores concuerdan con estudios comparativos realizados previamente en la misma finca, y en otras fincas bananeras en las que se ha confirmado la presencia de suelos supresivos a nematodos. Vargas et al 2012, compararon dentro de una misma finca bananera comercial ubicada en el cantón de Guácimo, provincia de Limón, Costa Rica, la densidad de nematodos en un área supresiva y en un área conduciva. Se encontró en promedio 8 546 y 26 865 nematodos totales en 100g de raíz, para el área

supresiva y conduciva, respectivamente, es decir, una reducción del 68,2%. De igual forma, encontró que el nematodo predominante en el área supresiva fue *Helicotylenchus* sp, que representó el 62,0% y que en el área conduciva fue *R. similis*, que representó el 82,9%.

Montenegro (2013) informa en dos fincas bananeras comerciales del cantón de Guácimo, Costa Rica, densidades de 4 600 y 10 172 nematodos totales, y de 228 y 7 164 *R. similis* en 100g de raíz en la finca calificada como supresiva; mientras que en otra calificada como no-supresiva, informó 19 285 y 17 808 nematodos totales y *R. similis*, respectivamente.

Cañizares (2003) a lo largo de 4 muestreos realizados en áreas sembradas con plátano (*Musa* AAB) cv. Curraré, encontró una menor cantidad de nematodos totales en áreas supresivas, respecto a áreas medianamente supresivas y no supresivas; sin embargo, *R. similis* siempre fue el nematodo dominante.

Cuadro 8. Comparación en cuanto a peso (g) de raíz funcional y raíz no funcional (g) por planta, y número de nematodos por 100g de raíces, entre el área supresiva y el área conduciva.

ÁREA	<i>R. similis</i>	<i>Helicotylenchus</i> sp	<i>Meloidogyne</i> sp	<i>Pratylenchus</i> sp	Nematodos totales	Raíz funcional (g)	Raíz no funcional (g)	Raíz total (g)
CONDUCTIVA	38.400	2.800	0	0	41.200	25	3	28
	16.000	8.400	0	0	24.400	34	3	37
PROMEDIO	27.200	5.600	0	0	32.800	30	3	33
SUPRESIVA	1.200	6.800	1.600	1.200	10.800	31	4	35
	1.600	5.600	0	2.000	9.200	26	5	31
PROMEDIO	1.400	6.200	800	1.600	10.000	29	5	33

*Cada muestra está compuesta por 5 submuestras.

Por otra parte, según se observa en el cuadro 9, el análisis químico del área supresiva mostró niveles de pH más elevados, una menor acidez y porcentajes de materia orgánica más favorables para la producción de banano, en

comparación con el área conduciva. En ambos casos la textura calificó como franco – arcillo- limosa.

Una condición similar encontró Vargas et al (2012) al comparar desde el punto de vista físico-químico, muestras de suelo provenientes de un área supresiva y conduciva de una misma finca. El pH fue de 6,2 y 5,0; la acidez intercambiable de 0,4 y 1,2 cmol(+)/L y el contenido de materia orgánica de 8,6 y 7,8%, para el área supresiva y conduciva, respectivamente. Asimismo, encontró una mayor concentración de calcio, magnesio, hierro, cobre y zinc en el área supresiva.

En un estudio realizado en 21 fincas bananeras de Costa Rica se encontró una relación inversa significativa entre el pH y la cantidad de nematodos totales en la raíz de plantas de banano. Al estar en presencia de pH ácidos, aumentó el número de nematodos; en pH más básicos, se encontró un menor número (Pattison 2011). Lo anterior podría explicar en parte, el efecto de factores abióticos como el pH, sobre la densidad de los nematodos totales y de *R. similis* encontrados entre el suelo supresivo y conducivo.

Cuadro 9. Análisis químico y textural del suelo proveniente del área supresiva.

ÁREA	pH	cmol(+)/L				mg/kg					M. org. (%)	Arena (%)	Arcilla (%)	Limo (%)	Nombre textural
		acidez	Ca	Mg	K	P	Fe	Cu	Zn	Mn					
CONDUCIVA	5,48	0,15	10,9	4,09	0,69	32	173	4,1	3,3	71	4,4	47	30	23	Franco arcillo arenoso Franco arcillo arenoso
	5,27	0,53	9,07	2,88	0,46	25	137	3,9	2,2	62	3,2	57	25	18	
PROMEDIO	5,38	0,34	9,99	3,49	0,58	28,5	155	4,0	2,8	66,5	3,8	52	27,5	20,5	-
SUPRESIVA	5,60	0,13	9,43	2,25	0,87	20	99	3,5	2,5	38	6,0	55	20	25	Franco arcillo arenoso Franco arcillo arenoso
	5,64	0,10	11,20	2,62	1,22	56	212	5,1	3,0	56	4,7	57	23	20	
PROMEDIO	5,62	0,12	10,32	2,44	1,05	38,0	156	4,3	2,8	47,0	5,4	56	21,5	22,5	-

*cada muestra está compuesta por 5 submuestras.

En cuanto al componente microbiológico cuantificado mediante el recuento de unidades formadoras de colonia por gramo de suelo (UFC/g), los análisis

realizados a dos muestras provenientes del área conduciva y dos del área supresiva, mostraron ligeras diferencias en las cantidades promedio de bacterias ($4,8 \times 10^7$ UFC/g y $3,16 \times 10^7$ UFC/g) y actinomicetes ($1,3 \times 10^6$ UFC/g y $1,85 \times 10^6$ UFC/g), así como moderadas diferencias en las cantidades de hongos totales ($1,89 \times 10^4$ UFC/g y $4,4 \times 10^3$ UFC/g), entre el área conduciva y el área supresiva, respectivamente (cuadro 10).

De acuerdo al estudio de rangos de hongos filiformes, bacterias aerobias y actinomicetes presentes en un total de 849 muestras de suelos bananeros realizado por el laboratorio de Control Biológico de CORBANA en el año 2011 (CORBANA, 2012), los contenidos promedio de hongos y bacterias observados en ambas áreas muestreadas se ubicaron dentro de los rangos representados por el 57,5% y el 54,1% del total de muestras incluidos en dicho estudio, respectivamente; por lo tanto se podría decir que se encontraron dentro de rangos normales para este tipo de suelos. No obstante, se encontró un número promedio elevado de actinomicetes en ambas muestras, únicamente representado por el 3,2% del total de muestras del estudio.

Considerando que los análisis microbiológicos no evidenciaron diferencias significativas en la composición de los grupos de microorganismos cuantificados, no se puede concluir que unos u otros son los responsables de la supresividad o no-supresividad de los suelos.

Se sabe que tanto en sistemas naturales como en sistemas agrícolas, la supresividad es el resultado de interacciones multitróficas de comunidades específicas de microorganismos interactuando unos con otros (Sikora et al 2010), por lo cual la caracterización microbiológica de un suelo supresivo mediante el estudio de los grupos filogenéticos que lo componen, es una tarea sumamente difícil. Lo anterior tiene su explicación en la gran cantidad de microorganismos diferentes presentes en el suelo, en la variedad de las interacciones, y en lo cambiante y dinámico de las poblaciones y de los factores que las pueden modificar.

Bajo el supuesto de que se ha caracterizado a un suelo como supresivo, identificar los organismos que intervienen en esa condición, puede ser también una tarea difícil, con la posible excepción de *Pasteuria penetrans*, quizá por su particular acción parasítica. Estudios que han demostrado la presencia de varios microorganismos con acción antagónica a *Heterodera schachii* aislados de quistes en un suelo supresivo, han fallado en explicar si esta condición es aportada por uno o varios de estos microorganismos (Timper 2011). Además, se ha demostrado experimentalmente, al menos para hongos nematófagos (*Hirsutella rhossiliensis*), que la supresividad puede expresarse en función de la densidad del antagonista (Westphal 2005).

Cuadro 10. Cantidades totales (UFC/g de suelo) de hongos, bacterias y actinomicetes presentes en el suelo conducivo y supresivo a nematodos.

ÁREA	UFC/g		
	HONGOS	BACTERIAS	ACTINOS
CONDUCIVA	$3,6 \times 10^4$	$2,7 \times 10^7$	$8,9 \times 10^5$
	$1,00 \times 10^2$	$7,0 \times 10^7$	$1,7 \times 10^6$
PROMEDIO	$1,8 \times 10^4$	$4,8 \times 10^7$	$1,3 \times 10^6$
SUPRESIVA	$8,7 \times 10^3$	$2,6 \times 10^7$	$8,7 \times 10^5$
	$1,0 \times 10^2$	$3,5 \times 10^7$	$2,6 \times 10^6$
PROMEDIO	$4,4 \times 10^3$	$3,1 \times 10^7$	$1,8 \times 10^6$

*cada muestra está compuesta por 5 submuestras.

4.2 Aislamientos obtenidos según tipo de muestra.

El cuadro 11 muestra el número de aislamientos obtenidos según el tipo de muestra procesada. Se obtuvieron 208 aislamientos a partir SER (64,4%), 97 aislamientos a partir de SR (30,0) y 18 a partir del tejido radical (5,6%).

Cuadro 11. Número de aislamientos obtenidos según tipo de muestra.

TIPO DE MUESTRA	N° AISLAMIENTOS CARACTERIZADOS	%
Suelo extra rizosférico	208	64,4
Suelo rizosférico	97	30,0
Raíz	18	5,6
TOTAL	323	100,0

Considerando que únicamente el 1% del total de microorganismos en general (Kaeberlein et al. 2002) y de bacterias (Vartoukian et al. 2010) descritas, puede ser exitosamente cultivadas en medios artificiales, y que a lo largo del proceso de investigación y desarrollo de Agentes de Control Biológico de plagas y enfermedades se ha determinado que únicamente el 1% del total de candidatos que se analiza, llega a convertirse en un Bioplaguicida de uso comercial (Kohl et al. 2011), la bioprospección de microorganismos que fue objetivo principal del estudio, es una tarea sumamente importante para incrementar las posibilidades de éxito en este tipo de proyectos.

El enfoque del estudio se realizó en género *Bacillus* ya que este ofrece una amplia gama de posibilidades. Un buen ejemplo de esto sucedió en el año 1987 cuando se anunció el descubrimiento de 72 nuevas variedades de *Bacillus thuringiensis* (Shand 1989). Wei et al. (2003) encontraron 4 nuevas proteínas *Cry* producidas por *B. thuringiensis*, con actividad a nematodos de vida libre, lo que posiblemente ha sido uno de los factores que ha incrementado el interés por esta bacteria (Rampersad y Ammons 2005). En hábitats naturales, la búsqueda de nuevas cepas de esta bacteria se ha convertido en una práctica internacional que ha permitido aumentar las posibilidades de uso (Carreras-Solís 2009).

Tal como se detalla en el cuadro 6, la mayoría de los aislamientos coleccionados provino de SER (64,4%), en segundo lugar de SR (30,0%) y en

menor grado de la raíz (5,6%). Estos resultados difieren con lo postulado por Sikora y Pocasangre (2004), quienes explican que la rizósfera al recibir exudados de la planta, es un sitio altamente colonizado que le aporta a la planta protección contra el ataque de patógenos. Duponnois et al (1998) indica además que estos exudados son sustancias de bajo peso molecular, muy fácilmente aprovechados por lo que la rizósfera presenta una mayor riqueza microbiana respecto al suelo externo a ella.

Por otro lado, el hecho de haber obtenido un número reducido de aislamientos a partir del tejido interno de la raíz, es congruente con lo informado por Lodewyckx et al. (2002), quienes explican que esta situación puede ser resultado del proceso de desinfección superficial, ya que los desinfectantes pueden penetrar los tejidos y eliminar parte de los microorganismos internos. Además señala que la densidad de bacterias endófitas es baja (entre $1,0 \times 10^3$ y $1,0 \times 10^5$ UFC/g de tejido) y mucho menor a la que puede alcanzar un patógeno bajo condiciones severas de enfermedad (entre $1,0 \times 10^9$ y $1,0 \times 10^{10}$ UFC/g de tejido).

No obstante, la menor densidad de bacterias endófitas, es compensada por la ventaja de vivir dentro de los tejidos, lo que le permite escapar de posibles competidores en el suelo (Medeiros et al. 2009).

4.3 Caracterización de los aislamientos y selección de los candidatos.

Mediante tinción de Gram se comprobó que el 100% de los aislamientos obtenidos, fueron Gram positivos demostrando la efectividad del proceso de pasteurización, el cual es ampliamente utilizado en estudios de bioprospección de bacterias relacionadas a *Bacillus* (Niedmann-Lolas y Meza-Basso 2006, Carreras-Solís 2009, Gallegos-Morales et al. 2009, Rodas-Junco et al. 2009 y Badia et al. 2011).

En un estudio de bioprospección de *Bacillus* spp presente en la rizósfera de melón, realizado con el objeto de seleccionar agentes para el combate de *Meloidogyne incognita* raza 2, se obtuvo un 48% de bacterias Gram positivas, utilizando el medio de cultivo NYDA, sin una pasteurización previa (Medeiros et al. 2009).

Adicionalmente, aplicando la técnica de tinción simple a cultivos de 5 días de incubación (esporulados), se encontró que el 80,9% de los aislamientos (261) mostraron la formación de endósporas típicas del género *Bacillus*, mientras que el restante 19,1% (62) no lo hizo. Este resultado es similar al reportado por Carreras-Solís (2009), quien obtuvo un rendimiento del 67,3% de bacterias esporulantes, a partir de 87 muestras de suelo provenientes hábitats naturales y tierras cultivadas de diversas regiones de Cuba.

En el presente estudio no se pasteurizó una suspensión de la muestra de suelos (SER y SR) en relación 1:10 (suelo y SSE), como normalmente se hace; en su lugar, se pasteurizó una dilución en base a 10 de ésta.

Es posible que el proceso de pasteurización en una suspensión más diluida y desprovista de gránulos de suelo, haya mejorado la transferencia de calor hacia los microorganismos presentes y haya favoreciendo una mayor eliminación de bacterias no formadoras de esporas. Siendo esto así, la alícuota inoculada en los platos petri con medio AN, pudo haber contenido una relación más elevada de este tipo de bacterias, a diferencia de cuando la pasteurización se realiza sobre suspensiones con mayor concentración de gránulos de suelo.

Del total de aislamientos que mostraron endósporas, el 64,9% (169) fueron obtenidos de SER, el 31,6% (83) de SR y el 3,5% (9) a partir de raíz. Del total de aislamientos que no mostraron endósporas, el 61,6% (38) fueron aislados de SER, el 24,7% (15) de SR y el 13,7% (8) de raíz. El cuadro 7 detalla los resultados indicados, y la figura 19, muestra una bacteria Gram+ (SER-35) con forma de bastón y con formación de endósporas, ambas características típicas del género *Bacillus*. El porcentaje de aislamientos esporulantes y no

esporulantes obtenidos según tipo de muestra, fue muy similar a los porcentajes obtenidos globalmente (cuadro 12).

Cuadro 12. Número de aislamientos con y sin endósporas visibles, de acuerdo al tipo de muestra y al total coleccionado.

TIPO DE MUESTRA	N° aislamientos con endósporas visibles	% Según tipo de muestra	N° aislamientos sin endósporas visibles	% Según tipo de muestra	TOTAL
Suelo extrarizosférico	169	64,8	39	62,9	208
Suelo rizosférico	82	31,4	15	24,2	97
Raíz	10	3,8	8	12,9	18
TOTAL	261	100,0	62	100,0	323
% Observación de endóspora	-	80,8	-	19,2	-



Figura 19. Células bacilares (en forma de "bastón") y endósporas típicas del género *Bacillus* sp (aislamiento SER-35).

Fuente: propia del autor.

El cuadro 13 muestra los diferentes dendrogramas generados por Treecom[®] para cada nivel de formación de grupos (≥ 3 , ≥ 4 y ≥ 5) y para los 16 niveles de características estudiados. Para cada caso se calculó el nivel de representatividad (%) y el número promedio de aislamientos incluidos dentro de cada grupo (tamaño de grupo).

Se observó que al reducir el número de características tomadas en consideración, aumentó la representatividad (%) y el tamaño de grupo. Esta tendencia puso de manifiesto que efectivamente, algunas de las características culturales y celulares utilizadas, lejos de robustecer la caracterización y la formación de grupos, más bien tendieron a disiparla en cuanto a los dos parámetros indicados. El efecto puede verse claramente en la figura 20.

Con base en los promedios de representatividad y de tamaño de los grupos (cuadro 13), se seleccionó el nivel de agrupamiento ≥ 4 , dado que este mostró mayor consistencia y equilibrio para ambos parámetros, alcanzando una representatividad promedio del 48,9% y un tamaño promedio de grupos de 9,5 aislamientos.

En contraposición, el nivel de agrupamiento ≥ 3 aislamientos mostró una mayor representatividad (56,4%), pero menor tamaño de los grupos (7,4 aislamientos); y el nivel de agrupamiento ≥ 5 , una menor representatividad (44,0%), pero mayor tamaño de grupos (11,1 aislamientos).

Cuadro 13. Número de características culturales y celulares según dendrograma, representatividad (%) y tamaño de los grupos formados.

DENDROGRAMA N°	N° CARACT.	TAMAÑO MÍNIMO DE GRUPOS					
		≥ 3		≥ 4		≥ 5	
		REPRESENT. (%)	N° AISLA./GRUPO	REPRESENT. (%)	N° AISLA./GRUPO	REPRESENT. (%)	N° AISLA./GRUPO
1	54	18,0	4,5	13,3	5,4	9,6	6,2
2	46	20,4	4,7	15,8	5,7	12,1	6,5
3	40	32,8	5,6	25,4	7,5	20,4	9,4
4	38	47,1	6,1	37,8	8,1	34,1	9,2
5	37	32,8	6,2	29,1	7,2	25,4	8,2
6	34	44,6	5,8	32,5	8,8	30,0	9,7
7	32	54,2	6,3	42,1	9,1	35,9	11,6
8	29	44,6	6,3	33,4	9,8	32,2	10,4
9	25	57,0	9,2	53,3	10,8	50,8	11,7
10	24	66,3	6,3	52,3	8,9	46,1	10,6
11	22	74,9	7,3	66,6	9,0	56,7	11,4
12	22	76,5	7,7	67,2	9,9	58,5	12,6
13	21	70,6	9,1	63,2	12,0	58,2	14,5
14	19	80,8	10,9	77,1	12,5	72,1	14,6
15	17	86,4	10,0	82,7	11,1	72,8	14,7
16	13	96,3	13,0	90,7	16,3	89,5	17,0
PROMEDIO		56,4	7,4	48,9	9,5	44,0	11,1

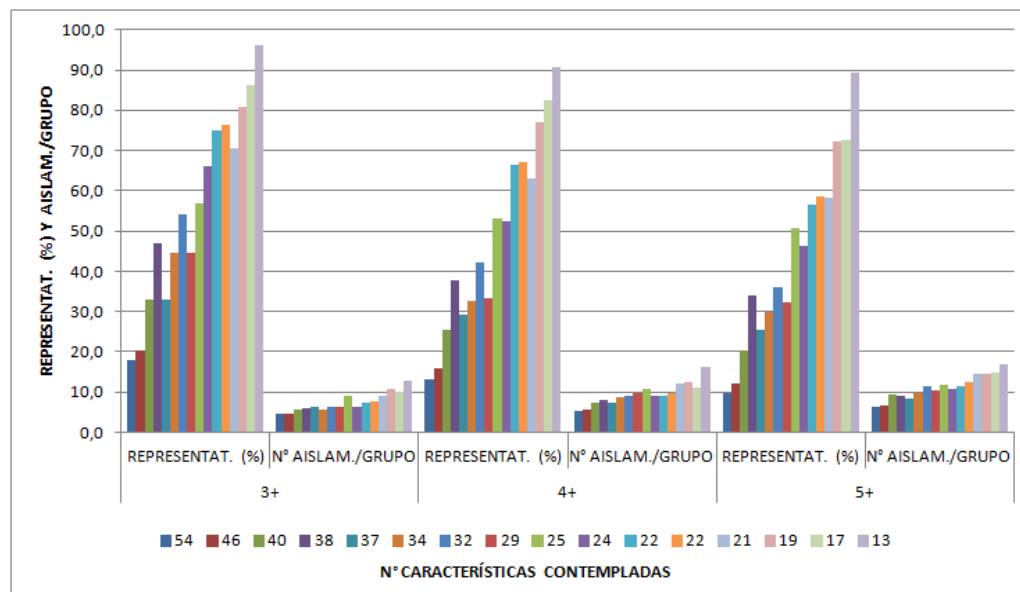


Figura 20. Efecto reductivo del número de características culturales y celulares, en la representatividad (%) de los dendrogramas y el incremento en el número promedio de aislamientos incluidos en cada grupo formado.

Como se observa en el cuadro 14 y la figura 21, al ir seleccionando y reduciendo el número de características estudiado, este nivel de agrupamiento (≥ 4), no solo cumplió con las mismas tendencias de aumento global en número de aislamientos por grupo y en cuanto a la representatividad de cada dendrograma, sino que también lo hizo en cuanto al número de grupos formados y al número de aislamientos acumulado en dichos grupos. A efecto de seleccionar el dendrograma con el número de características que mejor representara el universo de microorganismos caracterizados, se estudió nuevamente, los parámetros número de grupos formados, número de aislamientos incluido, el tamaño de los grupos y la representatividad (%) alcanzada. Como resultado del estudio, el dendrograma seleccionado fue el N° 14, el cual contempló el análisis de 19 características (14 del tipo cultural y 5 del tipo celular). Las razones para ello fueron: haber mostrado un buen balance entre el número de características de cada tipo estudiadas; haber reunido al tercer mayor número de microorganismos (249), obteniendo así la tercera más alta representatividad (77,1%); y por haber alcanzado el segundo lugar en cuanto al tamaño promedio de los grupos (12,5 aislamientos).

Cuadro 14. Reducción del N° de características y efecto sobre el N° de grupos formados (≥ 4), el total de aislamientos y la representatividad de cada dendrograma generado.

DENDROGRAMA N°	N° CARACT.	N° GRUPOS FORMADOS	N° AISLAMIENTOS INCLUIDOS	AISLAMIENTOS POR GRUPO	REPRESENT. (%)
1	59	8	43	5,4	13,3
2	46	9	51	5,7	15,8
3	40	11	82	7,5	25,4
4	38	15	122	8,1	37,8
5	37	13	94	7,2	29,1
6	34	12	105	8,8	32,5
7	32	15	136	9,1	42,1
8	29	11	108	9,8	33,4
9	25	16	172	10,8	53,3
10	24	19	169	8,9	52,3
11	22	24	215	9,0	66,6
12	22	22	217	9,9	67,2
13	21	17	204	12,0	63,2
14	19	20	249	12,5	77,1
15	17	24	267	11,1	82,7
16	13	18	293	16,3	90,7

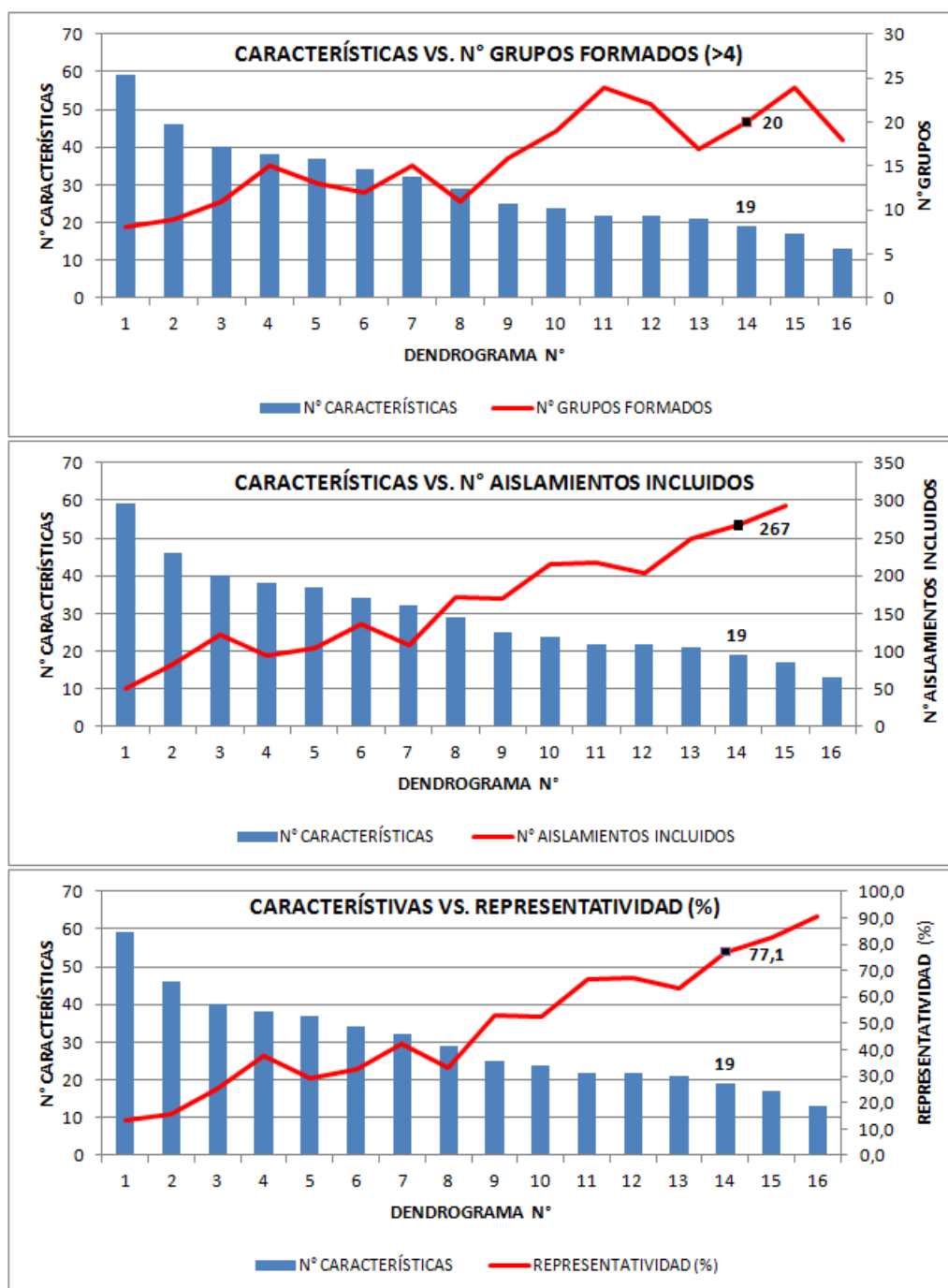


Figura 21. Efecto de la disminución del número de características, sobre el número de grupos formados (≥ 4), el número promedio de aislamientos incluido por grupo y la representatividad (%) dentro del total de microorganismos caracterizado.

Es importante señalar que los 20 grupos formados, compartieron como mínimo el 79% de sus características (promedio 89,2%), lo cual agrega robustez al dendrograma seleccionado (Cuadro 15).

Cuadro 15. Estructura del dendrograma N°14 (19 características), en cuanto a número de grupos, aislamientos incluidos y similitud compartida (%).

GRUPOS (≥ 4)	N° AISLAMIENTOS DEL GRUPO	SIMILITUD (%)
1	51	89,0
2	27	88,0
3	4	88,0
4	18	91,0
5	5	90,0
6	10	92,0
7	4	91,0
8	5	91,0
9	4	91,0
10	28	79,0
11	13	91,0
12	8	91,0
13	5	96,0
14	10	90,0
15	4	91,0
16	5	80,0
17	10	82,0
18	12	90,0
19	7	92,0
20	19	90,0
TOTAL AISLAMIENTOS	249	-
PROMEDIO	12,5	89,2

Con el objeto de comprobar la robustez señalada, se realizó un estudio tendiente a cuantificar la importancia de cada categoría (23 en total) incluida en la caracterización cultural y celular, frente a la importancia de aquellas que fueron tomadas en consideración en el dendrograma seleccionado.

Para ello, primero le fue otorgado un puntaje máximo o potencial de utilización a cada categoría; este se calculó multiplicando el número de opciones (características) dentro de cada categoría, por el número de dendrogramas generados (16). Por ejemplo, para la categoría de velocidad de crecimiento que consta de tres opciones (rápida, media y lenta), el puntaje máximo o potencial es de 48 puntos (3 opciones x 16 dendrogramas= 48). En segundo lugar, se calculó la utilización real de cada categoría, haciendo la sumatoria individual de los puntos otorgados a los dendrogramas que incluyeron a la categoría en cuestión. En tercer lugar, para obtener una nota o calificación porcentual del uso de cada categoría y evidenciar cuál fue su importancia en el estudio, se dividió el total de puntos obtenido, entre los puntos potenciales, y este producto se multiplicó por 100.

Tal como se observa en el cuadro 16, las categorías más utilizadas (con calificación ≥ 50) para describir las colonias fueron: color, borde, textura, rugosidad, opacidad (nubosidad) de la colonia y formación de filamentos; mientras que aquellas más utilizadas para describir las células fueron: longitud, y diámetro de los bacilos, forma de la endóspora y si ésta no era visible. Entre ambos grupos se contabilizó un total de 10 categorías con puntuación superior al 50%.

De las 10 características más utilizadas, 5 de ellas (color, borde, textura, forma de la endóspora y endósporas no visibles), fueron incluidas en el dendrograma N°14 (19 características); mientras que las restantes 5 no lo fueron (rugosidad, presencia de filamentos, nubosidad (opacidad), longitud y diámetro de la célula). Precisamente, el color, la forma, la textura y el tipo de borde de la colonia, así como la morfología de los bacilos y la presencia de endósporas, son las características básicas que describen al género *Bacillus* (Niedmann-Lolas y Meza-Basso 2006, Carreras-Solís 2009, Gallegos-Morales et al 2009, Rodas-Junco et al 2009) y por tanto, son utilizadas como herramienta para caracterizar y seleccionar aislamientos. En términos porcentuales se puede indicar que el 50% de las categorías más utilizadas, sí fueron tomadas en

consideración para generar el dendrograma seleccionado. Dado que el dendrograma seleccionado tomó en cuenta al 50% de las características más utilizadas y que estas obtuvieron las calificaciones más elevadas, la robustez del dendrograma seleccionado quedó de manifiesto.

Cuadro 16. Calificación de las características totales y de las características utilizadas para la generación del dendrograma seleccionado (N° 14).

CATEGORÍAS		Opciones (características) dentro de la categoría	Utilización potencial de la categoría	Dendrograma generado y número de características contemplado																Utilización real de la categoría	
				N°1	N°2	N°3	N°4	N°5	N°6	N°7	N°8	N°9	N°10	N°11	N°12	N°13	N°14	N°15	N°16	Total Ptos.	Calificación resp. a potencial de la categoría
				54	46	40	38	37	34	32	29	25	24	22	22	21	19	17	13		
COLONIA	Velocidad de crec.	3	48	3	0	0	3	3	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	12	25,0
	Forma	5	80	5	5	3	5	5	3	4	3	0	4	0	0	0	0	0	0	37	46,3
	Tamaño	3	48	3	3	0	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	25,0
	Color	6	96	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	0	84	87,5	
	Borde	5	80	5	5	5	5	0	5	5	0	5	0	5	0	5	0	0	50	62,5	
	Elevación	5	80	5	5	5	5	0	0	0	0	0	0	5	5	0	0	0	0	30	37,5
	Textura	3	48	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	0	45	93,8	
	Estrías gdes.	1	16	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	6,3
	Estrías med.	1	16	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	12,5
	Estrías peq.	1	16	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	4	25,0
	Rugosa	1	16	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	12	75,0
	Borde blanco	1	16	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	12,5
	Borde y ctro bl.	1	16	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	12,5
	Borde tenue	1	16	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	18,8
	Nubosa	1	16	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	12	75,0
Con filam.	1	16	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	12	75,0	
Lobul. denso	1	16	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	7	43,8	
Lobul. tenue	1	16	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	18,8	
CÉLULA	Longitud	3	48	3	3	3	0	3	3	3	3	3	0	0	0	3	0	0	30	62,5	
	Forma	2	32	2	2	2	0	1	2	2	1	0	0	0	0	0	0	2	14	43,8	
	Grosor	3	48	3	3	3	0	3	3	0	3	0	3	0	0	0	0	3	24	50,0	
	Forma de endósp.	4	64	4	4	4	0	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	60	93,8	
	Endósp. no visible	1	16	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	15	93,8	
TOTAL	23	54	864	54	46	40	38	37	34	32	29	25	24	22	22	21	19	17	13	473	-

La figura 22 muestra el dendrograma generado por Treecom[®] para la caracterización de 323 aislamientos, mediante 19 características. Las flechas azules señalan los grupos formados por 4 ó más microorganismos compartiendo al menos el 79% de sus características.

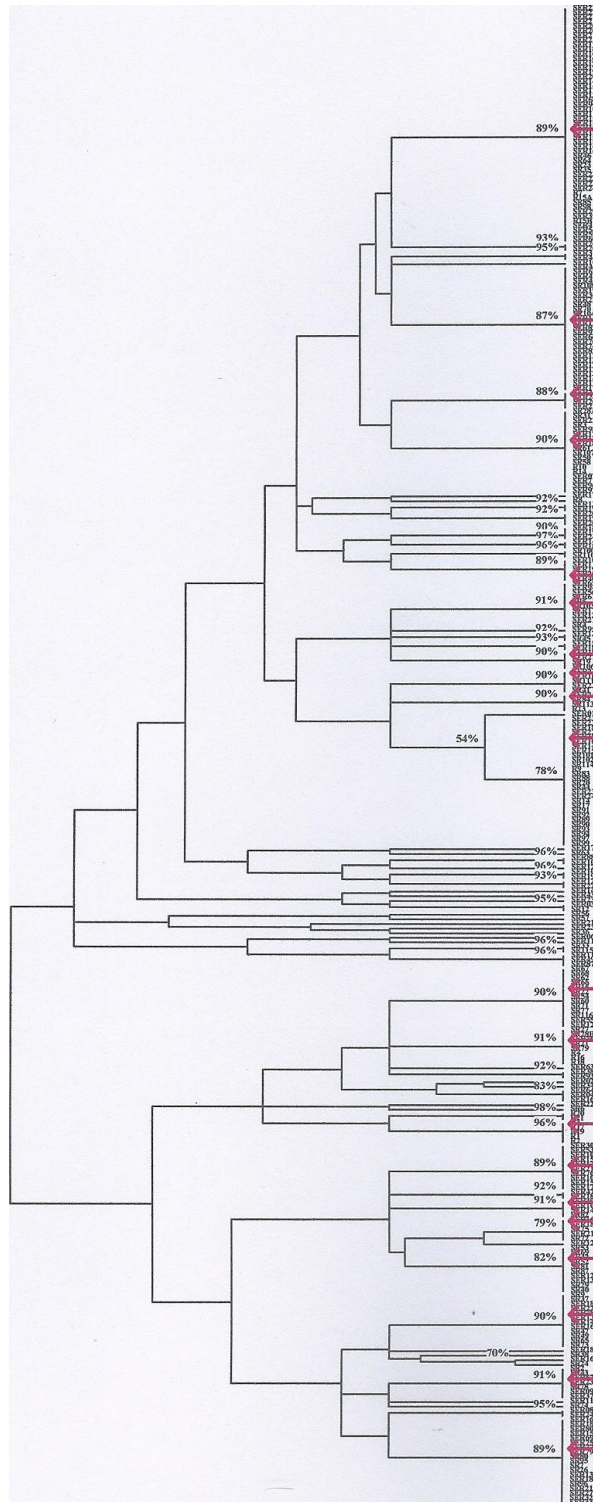


Figura 22. Dendrograma generado por Treecom para 19 características. Las flechas rojas señalan los 20 grupos formados por 4 ó más microorganismos, compartiendo como mínimo el 79% de sus características.

El sistema implementado para la caracterización y agrupamiento mediante aspectos morfológicos de las colonias y de las células, tal como se indicó, no es una novedad; sin embargo, el uso de un programa estadístico para darle una total objetividad a la formación de los grupos, sí es novedoso. Mediante esta base de datos, en el futuro será posible manipular la escogencia de los aislamientos utilizando una o varias de las 54 características empleadas, dependiendo del interés que se tenga.

Alternativamente a la caracterización de aislamientos bacterianos realizada en este estudio, se pueden utilizar otras técnicas como la microscopía, electroforesis de preparaciones de esporas y cristales en gel de poliacrilamida, PCR utilizando primers específicos para las distintas proteínas *Cry*, la amplificación y secuenciación del gen 16rDNA, análisis inmunológicos de las δ -endotoxinas y la aplicación de diferentes test bioquímicos como la hidrólisis de la gelatina, la prueba de KOH, la utilización del citrato, actividad de la catalasa y de la amilasa (Wei et al. 2003, Arrieta y Espinosa 2005, Huang et al. 2005, Niedmann-Lolas y Meza-Basso 2006, Gallegos-Morales et al. 2009, Vetrivelkai et al. 2010).

Con base en la estructura de los grupos formados, el máximo de tratamientos a utilizar en el experimento de vivero y las cantidades de aislamientos obtenidos según tipo de muestra (SER, SR y R), se realizó una selección de 20 aislamientos, la cual abarcó 16 de los 20 grupos formados, e incluyó a dos aislamientos no agrupados pero que morfológicamente mostraron diferencias sustanciales (SER-106 y SR-12). El cuadro 17 detalla los aislamientos seleccionados, el tipo de muestra del cual fueron aislados y el grupo al cual pertenecen.

Cuadro 17. Tratamientos preseleccionados para el experimento de vivero.

GRUPO	CÓDIGO	TIPO DE MUESTRA
1	SER-35	suelo extrarizosférico
1	SR-23	suelo rizosférico
1	R-15B	raíz
2	SER-132	suelo extrarizosférico
3	SER-246	suelo extrarizosférico
4	SER-173	suelo extrarizosférico
5	SER-26	suelo extrarizosférico
6	SR-05	suelo rizosférico
7	SER-217	suelo extrarizosférico
8	SER-23	suelo extrarizosférico
9	R-13	raíz
10	SER-25	suelo extrarizosférico
11	SR-62	suelo rizosférico
12	SER-80	suelo extrarizosférico
14	SER-10	suelo extrarizosférico
17	SR-87	suelo rizosférico
18	SER-222	suelo extrarizosférico
20	SER-80	suelo extrarizosférico
SIN GRUPO	SER-106	suelo extrarizosférico
SIN GRUPO	SR-12	suelo rizosférico

La selección realizada respetó además los porcentajes de microorganismos según tipo de muestra de la cual fueron aislados y coleccionados originalmente: 64,4% (SER), 30,0% (SR) y 5,6% (R). En ese sentido, para el experimento de vivero se incluyó 13 aislamientos obtenidos de SER (65,0%), 5 de SR (25,0%) y 2 de R (10,0%). El cuadro 18 muestra de forma comparativa los datos anteriormente señalados.

Cuadro 18. Número de aislamientos seleccionados para el experimento de vivero y su relación con la distribución porcentual de microorganismos coleccionados de acuerdo a su origen.

ORÍGEN	VIVERO		COLECCIÓN	
	N° Aislamientos	%	N° Aislamientos	%
SER	13	65,0	208	64,4
SR	5	25,0	97	30,0
R	2	10,0	18	5,6
TOTAL	20	100,0	323	100,0

4.4 Identificación Molecular.

Mediante la técnica de PCR y electroforesis con gel de agarosa, se logró comprobar que 19 de los 21 aislamientos extraídos del suelo supresivo, amplificaron con los iniciadores específicos para *Bacillus*, formando bandas congruentes en cuanto al número de pares de bases (600 pb), respecto al control positivo utilizado (figura 23 a). Los dos aislamientos SER-217 y R-4 que no amplificaron con los iniciadores específicos empleados, sí amplificaron los los iniciadores generales para bacterias (figuras 23 b y c), por lo que todos los aislamientos pudieron ser enviados a secuenciación a Macrogen.

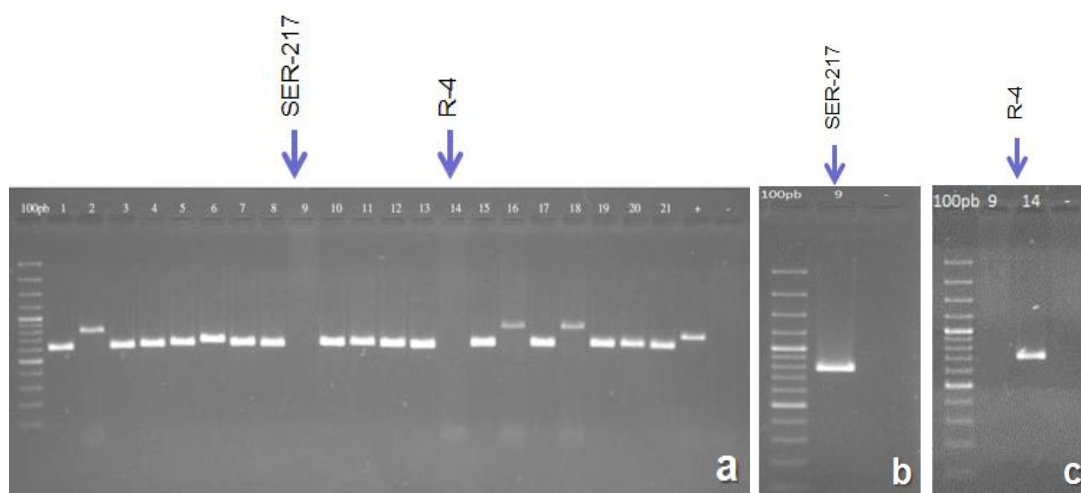


Figura 23. Gel de Agarosa 1.5%, mostrando la amplificación los iniciadores específicos Bac F y Bac R (a) y generales para bacterias (b y c) (Kuske, et al. 1998).

El cuadro 19 muestra los resultados de la identificación molecular de los 21 aislamientos que fueron enviados a secuenciar. Dentro de este grupo se incluyó al aislamiento B-72 obtenido de la colección de Bioversity International.

Se observa que utilizando la base de datos RDP (The Ribosomal database Project) que es específica para bacterias, la identificación únicamente llegó a nivel de género, siendo que del total de aislamientos analizado, que fue de 20 (excluyendo a B-72), 16 correspondieron al género requerido. Lo anterior quiere decir que el 80,0% del total de aislamientos seleccionados correspondió con el género hacia el cual se dirigió el protocolo de aislamiento.

El restante 20% (4 aislamientos) se compuso por SR-23 y SER-23 los cuales a pesar de haber amplificado con los iniciadores específicos para *Bacillus*, las secuencias generadas por MacroGen no fueron lo suficientemente claras como para poder identificarlos; y por SER-217 y R-4 que amplificaron con iniciadores generales los iniciadores utilizados, pero que únicamente el segundo pudo ser identificado como *Acinetobacter* sp.

Acinetobacter sp es un cocobacilo Gram-negativo presente en el agua, el suelo, en la piel, e incluso a nivel faríngeo y estomacal, y que además puede sobrevivir en objetos inanimados. Algunas especies dentro de este género son catalogadas como potenciales agentes patogénicos de personas con estancias intrahospitalarias prolongadas, sometidas a catéteres intravenosos y/o urinarios y al uso de antibióticos de manera prolongada. La agrupación de cepa de mayor interés clínico es la formada por el complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baummanii* (Garnacho, *et al.* 2004).

Por otra parte, utilizando la base de datos de NCBI (National Center Biotechnology Information), que no es específica para bacterias, se logró identificar a 10 aislamientos como pertenecientes a la especie *B. thuringiensis* (47,6% del total); 4 a *B. pumilus* (19,0%); y uno (4,8%) a cada una de las siguientes especies: *B. mycoides*, *B. cereus*, *B. subtilis*.

Asimismo, mediante esta base de datos se identificó al aislamiento R-4, como *Acinetobacter radioresistans*, bacteria que es un componente normal en la microflora de la piel, pero que ha sido también descrita como un potencial agente causal de bacteriemias en pacientes con el sistema inmunológico deprimido, como es el caso de pacientes con SIDA (Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida) (Visca *et al.* 2001). Por esta razón esta bacteria fue sustituida en el experimento por el aislamiento B-72.

Cuadro 19. Identificación de las secuencias amplificadas del gen RNA16S mediante PCR, por medio de las bases de datos RDP (The Ribosomal database Project) y NCBI (National Center Biotechnology Information).

#	Cód Lab BM	Cód muestra	Organismo (s) Coincidentes RDP	% conf	Organismo (s) Coincidentes NCBI	% ident
1	12-1	SER-35	<i>Bacillus sp.</i>	100	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99
2	12-2	SR-23	**		**	99
3	12-3	R-15B	<i>Bacillus sp.</i>	100	<i>Bacillus cereus</i>	99
4	12-4	SEP-132	<i>Bacillus sp.</i>	100	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99
5	12-5	SER-246	<i>Bacillus sp.</i>	100	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99
6	12-6	SER-173	<i>Bacillus sp.</i>	100	<i>Bacillus thuringiensis</i>	100
7	12-7	SER-26	<i>Bacillus sp.</i>	96*	<i>Bacillus pumilus</i>	100
8	12-8	SR-05	<i>Bacillus sp.</i>	100	<i>Bacillus mycoides</i>	100
9	12-9	SER-217	**		**	
10	12-10	SER-23	**		**	
11	12-11	R-13	<i>Bacillus sp.</i>	100	<i>Bacillus thuringiensis</i>	100
12	12-12	SER-25	<i>Bacillus sp.</i>	100	<i>Bacillus thuringiensis</i>	100
13	12-13	SR-62	<i>Bacillus sp.</i>	98*	<i>Bacillus pumilus</i>	100
14	12-14	R-4	<i>Acinetobacter sp.</i>	100	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	100
15	12-15	SER-10	<i>Bacillus sp.</i>	96*	<i>Bacillus pumilus</i>	100
16	12-16	SER-222	<i>Bacillus sp.</i>	100	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99
17	12-18	SER-106	<i>Bacillus sp.</i>	99	<i>Bacillus subtilis</i>	99
18	12-19	SR-12	<i>Bacillus sp.</i>	100	<i>Bacillus thuringiensis</i>	100
19	12-20	B-72	<i>Bacillus sp.</i>	100	<i>Bacillus thuringiensis</i>	100
20	12-21	SR-87	<i>Bacillus sp.</i>	99	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99
21	12-22	SER-80	<i>Bacillus sp.</i>	97*	<i>Bacillus pumilus</i>	100

* Fuera del rango aceptable.

** La secuencia no fue clara para determinar la identificación de la muestra.

El análisis de agrupamiento (UPGMA) mostró claramente la formación de tres grupos de microorganismos que en la figura 24 se identifican por los rectángulos de color rojo.

El primer grupo con 99% de significancia estadística, de acuerdo a la secuenciación de la base de datos NCBI, se compuso por bacterias pertenecientes a *Bacillus thuringiensis* (SER-135, SER-132, SER-222, B-72, SER-246, SER-173, R-13, SR-12, SER-25 y SR-87), pero también por *Bacillus cereus* (R-15B) y a *Bacillus mycoides* (SR-05).

El segundo grupo de aislamientos que presentó un 98% de significancia estadística, según NCBI se compuso por aislamientos relacionados a *Bacillus pumilus* (SR-62, SER-10, SER-26 y SER-80) y a *Bacillus subtilis* (SER-106).

El tercer grupo estuvo compuesto únicamente por el aislamiento R-4 (*Acinetobacter* sp), el cual no compartió ninguna similitud con ningún otro aislamiento. De acuerdo a la base de datos NCBI, esta bacteria fue identificada como *A. radioresistens*. En dicha figura no aparecen los aislamientos que no pudieron ser identificados.

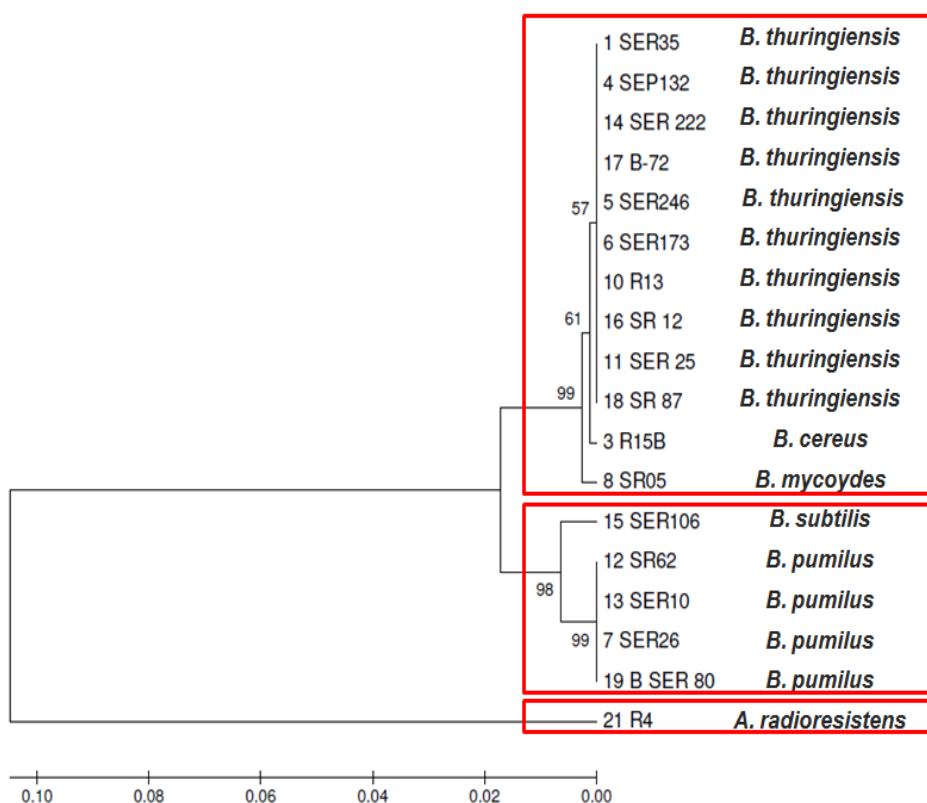


Figura 24. Análisis de agrupamiento UPGMA, MEGA 5.10.

De acuerdo a las referencias indicadas en el cuadro 20, todas las especies de *Bacillus* identificadas por NCBI, han sido reportadas con efecto sobre diferentes especies de nematodos (*B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. mycooides*, *B.*

subtilis y *B. pumilus*), lo cual podría ser un factor a favor de su evaluación frente a los nematodos que atacan al banano.

Cuadro 20. Referencias de especies de *Bacillus* con efecto sobre nematodos.

ESPECIE	NEMATODO	REFERENCIA
<i>B. firmus</i>	<i>Meloidogine incognita</i> , <i>Radopholus similis</i> , <i>Ditylenchus dipsaci</i>	Mendoza et al. (2008), Terefe et al. (2009).
<i>B. subtilis</i>	<i>R. similis</i>	Jonathan y Umamaheswari (2006).
<i>B. nematocide</i>	<i>Panagrellus redivivus</i>	Huang et al. (2005).
<i>B. thuringiensis</i>	<i>Meloidogine incognita</i> , <i>Caenorhabditis elegans</i>	Leyns et al. 1995., Márquez-Gutiérrez y Fernández-González (2006), Jouzani et al. (2008).
<i>B. cereus</i>	<i>Meloidogine incognita</i> , <i>M. javanica</i>	Gotke y Swarup (1988), Oka et al. (1993), citados por Siddiqui y Mahmood (1999).
<i>B. pumilus</i>	<i>Meloidogine incognita</i> , <i>Heterodera cajani</i>	Gotke y Swarup (1988), Oka et al. (1993), citados por Siddiqui y Mahmood (1999).
<i>B. lincheniformis</i>	<i>Meloidogine incognita</i>	Siddiqui y Husain (1991), citado por Siddiqui y Mahmood (1999).
<i>B. mycoides</i>	<i>Paratrichodorus pachydermus</i> , <i>Trichodorus primitivus</i> , <i>Caenorhabditis elegans</i> y <i>Pristionchus pacificus</i>	Insunza et al. (2002), Rae et al. (2010).
<i>B. megaterium</i>	<i>Meloidogyne graminicola</i>	Padgham y Sikora (2008).
<i>B. weihenstephanensis</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i> y <i>Pristionchus pacificus</i>	Rae et al. (2010).

4.5 Experimento de vivero.

4.5.1 Estudio comparativo de las características químicas y microbiológicas del suelo supresivo y el suelo de siembra, previo y al final del experimento.

El cuadro 21 muestra el promedio de los parámetros químicos observados en el suelo supresivo (n=2) y el suelo de siembra, tanto al inicio (n=3), como al final del experimento, según tipo de tratamiento.

Al comparar el suelo supresivo (donador de los aislamientos), con el suelo de siembra (receptor de los aislamientos), se observa un pH mayor, una acidez menor y en general, una mejor condición nutricional en el segundo suelo. En cuanto a la textura, el suelo supresivo calificó como franco-arcillo-arenoso, mientras que el suelo de siembra, como franco.

Por otra parte, al comparar los parámetros químicos del suelo de siembra al inicio y al final del experimento, se observó una tendencia hacia la acidificación (disminución del pH, incremento de la acidez intercambiable) y en general, a una menor concentración de los elementos químicos. Posiblemente la acidificación del suelo se debió a la adición de la solución de Hoagland cuyo pH es de 5,6; mientras que la disminución de los contenidos de elementos, se pudo deber a una mayor extracción por parte de la planta, en comparación al aporte proveniente de la solución nutritiva. El análisis químico mostró además una mayor acidificación en el tratamiento con Vydate® 24SL.

Cuadro 21. Promedios de pH, materia orgánica, elementos mayores y menores del suelo supresivo (n=2), suelo de siembra (n=3) y suelo al final del experimento, según tipo de tratamiento (SER= suelo extrarizosférico. SR= suelo rizosférico. R=raíz).

MUESTRA	pH	cmol(+)/L				mg/L					MO%
		Acidez	Ca	Mg	K	P	Fe	Cu	Zn	Mn	
S. SUPRESIVO* (n=2)	5,62	0,12	10,32	2,44	1,05	38	156	4,3	2,8	47	5,4
S. MACETAS** (n=3)	6,22	0,04	14,67	3,42	4,07	117	194	7,8	24,2	60	6,9
SUELO DE MACETAS AL FINAL DEL EXPERIMENTO (SEGÚN TIPO DE TRATAMIENTO)											
SER (n=11)	5,48	0,10	11,96	3,55	3,11	91	181	6,6	20,7	37	6,8
SR (n=5)	5,47	0,08	11,70	3,49	2,86	77	145	6,5	15,3	39	6,7
R (n=3)	5,50	0,09	12,07	3,65	3,10	97	183	6,7	20,2	41	6,9
TEST. COM. (n=1)	5,16	0,25	9,80	3,40	2,52	102	179	5,0	20,4	34	7,5
TEST. ABS. (n=1)	5,56	0,14	12,30	3,52	3,18	102	176	6,2	16,9	37	6,8
TEST.NEMA (n=1)	5,58	0,10	12,00	3,68	2,96	94	179	5,8	16,2	35	6,5

* Textura franco-arcillo-arenosa. **Textura franca

Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en cuanto al contenido de elementos a nivel foliar para los diferentes tratamientos (cuadro 22).

Cuadro 22. Contenidos foliares promedio de elementos químicos según tratamiento.

TRATAMIENTO	CÓDIGO ASLAMIENTO	% SOBRE BASE SECA						mg/kg					
		N	P	K	Ca	Mg	S	Fe	Cu	Zn	Mn	B	Al-e
1	SER-35	3,22	0,17	8,11	1,04	0,48	0,21	232	9,2	81	286	27	157
2	SR-23	3,34	0,15	8,89	1,19	0,56	0,22	217	9,0	58	292	25	229
3	R-15B	3,52	0,21	8,90	1,19	0,50	0,21	235	10,1	82	276	32	251
4	SER-132	3,36	0,16	8,94	1,08	0,55	0,22	266	8,7	61	251	25	224
5	SER-246	3,27	0,18	9,79	1,03	0,50	0,21	324	9,3	78	292	26	358
6	SER-173	3,58	0,20	9,74	0,90	0,46	0,22	340	10,0	90	182	28	404
7	SER-26	3,16	0,17	8,96	1,01	0,51	0,22	142	8,3	84	236	27	103
8	SR-05	3,22	0,14	8,24	1,17	0,57	0,22	226	7,6	57	255	25	232
9	SER-217	3,19	0,18	8,89	1,14	0,58	0,22	382	9,0	76	297	26	343
10	SER-23	3,27	0,18	9,09	1,09	0,57	0,21	173	9,1	68	194	29	152
11	R-13	3,37	0,17	9,29	1,01	0,54	0,20	229	9,2	65	231	28	212
12	SER-25	3,46	0,20	10,50	1,12	0,52	0,20	226	9,8	65	155	3	223
13	SR-62	3,03	0,15	9,11	1,20	0,57	0,20	271	8,6	81	287	24	191
14	R-4	3,25	0,19	9,22	1,04	0,48	0,20	184	9,6	83	302	3	156
15	SER-10	3,31	0,17	8,91	1,10	0,52	0,20	332	9,8	79	317	29	357
16	SR-87	3,52	0,20	9,36	1,07	0,50	0,21	317	10,3	85	262	29	303
17	SER-222	3,08	0,15	8,49	1,08	0,56	0,20	205	8,5	65	204	27	197
18	COR B-72	3,40	0,17	8,96	1,20	0,56	0,22	277	10,0	84	406	28	257
19	SER-106	3,34	0,18	9,25	1,13	0,56	0,22	4	9,5	7	246	31	259
20	SR-12	3,59	0,16	9,14	1,12	0,52	0,23	28	9,3	7	318	26	27
21	TEST.COM.	3,73	0,19	8,34	0,91	0,33	0,26	226	7,2	60	278	26	235
22	TEST.ABS.	3,82	0,21	9,64	0,93	0,37	0,24	265	7,6	72	276	28	303
23	TEST.NEMA.	3,82	0,18	9,14	0,97	0,37	0,24	182	6,6	52	204	25	173

Fueron evidentes diferencias importantes en la composición microbiológica entre el suelo supresivo y el suelo de siembra, encontrándose más actinomicetes en el primero, pero más hongos y bacterias en el segundo (cuadro 23). Esto pudo deberse características propias de cada suelo, pero además, a que la finca de donde se tomó el suelo para el llenado de los potes, implementa un programa intensivo de mejora en la salud y la calidad del suelo a través de la aplicación de sustratos orgánicos altamente colonizados por microorganismos (gallinaza, bocashi, compost y biofermentos).

Asimismo, al comparar los contenidos promedio de microorganismos del suelo al inicio y el final del experimento, se observó una menor cantidad de hongos en los testigos, y similares cantidades en los tratamientos que recibieron

bacterias (SER, SR y R). En términos generales, se observó un número similar de bacterias y una menor cantidad de actinomicetes entre el inicio y el final del experimento.

Tal como fue discutido anteriormente, fueron evidentes diferencias importantes en las características químicas y texturales entre el suelo donador y el suelo receptor de los aislamientos.

Estas diferencias pudieron ser un factor importante en la fijación y colonización de las bacterias aplicadas, o bien, en la expresión su actividad biológica, dado que estas fueron extraídas de suelos diferentes. Strigul y Kravchenko (2006) señalan que la exitosa introducción de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal en un tipo de suelo, no asegura que vaya a ser también exitosa en un suelo diferente. Además señalan que esto se debe a la interacción tanto de factores bióticos, como abióticos. Dentro de los segundos, se señala precisamente al pH y a otros factores como la temperatura del suelo, la disponibilidad de oxígeno y de nutrientes, el contenido de agua, el tipo de suelo, el contenido de arcilla, la textura y la estructura de los microporos.

Kremer (2006), igualmente indica que la colonización de las rizobacterias se ve afectada por el pH y la textura, pero además agrega el contenido de carbón orgánico y las prácticas de manejo, como dos factores determinantes.

Los factores bióticos que influyen la colonización y la actividad biológica de las bacterias tienen que ver principalmente con la producción y el tipo de los exudados que libera la planta, las interacciones biológicas como la depredación por protozoarios y nematodos, y la competencia interespecífica por recursos (Strigul y Kravchenko 2006, Kremer 2006, Avis et al 2008).

Finalmente, los contenidos de hongos fueron mayores en los tratamientos con aplicación de bacterias, mientras que los de actinomicetes fueron similares. Es posible que los hongos hayan sido exitosos en la utilización de las células bacteriales no viables, de subproductos de éstas e incluso, de trazas del medio

de cultivo de las bacterias, logrando así propagarse en mayor medida respecto a los tratamientos que no recibieron bacterias.

Cuadro 23. Contenido de hongos, bacterias y actinomicetes totales en el suelo (UFC/g), según tipo de tratamiento.

MUESTRA	UFC/g		
	HONGOS	BACTERIAS	ACTINOS
S. SUPRESIVO* (n=2)	$4,4 \times 10^3$	$3,1 \times 10^7$	$1,8 \times 10^6$
S. MACETAS** (n=3)	$4,0 \times 10^4$	$1,6 \times 10^8$	$3,4 \times 10^5$
SUELO DE MACETAS AL FINAL DEL EXPERIMENTO (SEGÚN TIPO DE TRATAMIENTO)			
SER (n=11)	$8,8 \times 10^3$	$9,3 \times 10^7$	$1,4 \times 10^6$
SR (n=5)	$1,4 \times 10^4$	$8,2 \times 10^7$	$2,3 \times 10^6$
R (n=3)	$1,2 \times 10^4$	$6,4 \times 10^7$	$1,2 \times 10^6$
TEST. COM. (n=1)	$1,0 \times 10^2$	$7,1 \times 10^7$	$4,4 \times 10^6$
TEST. ABS. (n=1)	$1,0 \times 10^2$	$3,4 \times 10^8$	$1,0 \times 10^4$
TEST.NEMA. (n=1)	$1,0 \times 10^2$	$1,9 \times 10^8$	$7,9 \times 10^6$

4.5.2 Producción de inóculo y estandarización de la concentración.

La utilización del patrón 0,5 de Mc Farland permitió estandarizar la concentración (ufc/g) de cada bacteria utilizada en el experimento de vivero, de tal forma que esta fuera reproducible a lo largo del experimento, tanto para la inoculación inicial mediante la inmersión del sistema radical, como para las subsiguientes inoculaciones en forma de “drench”. El cuadro 24 muestra que la concentración entre los diferentes tratamientos fluctuó entre $1,2 \times 10^7$ y $5,4 \times 10^8$ UFC/ml.

Cuadro 24. Concentración (ufc/g) de cada bacteria según tratamiento, utilizada para inocular vitroplantas de banano.

TRATAMIENTO	CÓDIGO	CONCENTRACIÓN FINAL (ufc/ml)
1	SER-35	2,4E+08
2	SR-23	1,8E+07
3	R-15B	3,5E+07
4	SER-132	1,2E+07
5	SER-246	2,0E+07
6	SER-173	1,7E+07
7	SER-26	1,5E+08
8	SR-5	1,8E+07
9	SER-217	4,8E+08
10	SER-23	1,7E+07
11	R-13	2,9E+07
12	SER-25	2,3E+07
13	SR-62	5,4E+08
14	SER-80	7,2E+07
15	SER-10	4,2E+08
16	SR-87	1,5E+07
17	SER-222	2,0E+07
18	B-72	4,4E+07
19	SER-106	1,9E+08
20	SR-12	2,0E+08

De acuerdo a la literatura consultada, no existe una concentración base para realizar experimentación dirigida a la selección de bacterias para el control de nematodos. Algunos estudios resaltan diferencias en el control en función de la concentración utilizada, mientras que otros, en donde se ha utilizado una misma concentración, resaltan las diferencias en mortalidad en función del aislamiento aplicado.

Leyns et al. (1995) en estudios *in vitro* realizados para evaluar el efecto de *Bacillus thuringiensis* sobre el nematodo bacteriófago *Caenorhabditis elegans*, encontraron diferencias significativas al utilizar un rango de concentraciones entre 10^7 y 10^9 partículas/ml. A una concentración de 10^7 no hubo mortalidad; a 10^8 la mortalidad llegó al 30% y a 10^9 llegó hasta el 53%, dependiendo del aislamiento.

Márquez-Gutiérrez y Fernández-González (2006), utilizando diferentes aislamientos de *B. thuringiensis* una concentración de $1,0 \times 10^7$ esporas/ml, encontraron mortalidades de *M. incognita* entre el 0 y el 100%. Similarmente, Siddiqui et al. (2009) encontraron diferencias significativas en la eclosión de *M. incognita*, en la penetración del nematodo a la raíz de plantas de arveja (*Pisum sativum*), en la colonización radical de las bacterias y en el tamaño de la raíz y parte aérea, al aplicar diferentes aislamientos de *Bacillus* y *Pseudomonas* a una concentración de $1,5 \times 10^7$ células/ml.

Mendoza et al. (2008), utilizando un producto comercial a base de *Bacillus firmus*, encontraron rangos de mortalidad de *Radopholus similis* en potes con arena no esterilizada, entre el 25 y el 41%, lo cual se asoció tanto a la concentración ($3,8 \times 10^6$ hasta $1,0 \times 10^9$ células/ml), como al tiempo de exposición (uno, 3 y 7 días).

El uso de la espectrofotometría ofrece la posibilidad de relacionar la turbidez de un cultivo o suspensión bacteriana, con su concentración en UFC/ml, permitiendo hacer reproducible la investigación. Padgham y Sikora (2007), en estudios a nivel de vivero con plántulas de arroz, utilizaron concentraciones bacteriales ajustadas a una densidad óptica de 560 nm (correspondiente a $6,0 \times 10^6$ UFC/ml de *Bacillus megaterium*), para evaluar su desempeño en el control de *Meloidogyne graminícola*, obteniendo en estudios repetitivos, hasta un 44% de reducción en la penetración del nematodo.

En el presente estudio, de forma alternativa se recurrió al método turbidimétrico mediante la escala de Mc Farland para poder estandarizar la concentración de las bacterias y poder reproducirla en las subsiguientes aplicaciones. Se puede decir por tanto, que los rangos de concentraciones utilizadas en los experimentos indicados, fueron muy similares a los que se utilizaron en el presente estudio.

4.5.3 Efecto de los tratamientos sobre las variables de crecimiento.

El cuadro 25 muestra los promedios (\pm error estándar) de las variables de crecimiento estudiadas, así como la probabilidad ($Pr>F$) de que las diferencias entre los promedios de los tratamientos, se deban al azar. Al comparar los promedios de los diferentes tratamientos con el promedio alcanzado por TESTNEMA, únicamente se encontraron diferencias estadísticas para la variable Peso Fresco de Raíz ($P=0,0025$), siendo los tratamientos SER-217 ($28,6 \pm 2,7g$), SER-23 ($23,3 \pm 2,2g$) y SR-05 ($22,9 \pm 1,9 g$) los que promovieron significativamente el crecimiento.

Cuadro 25. Promedio (\pm error estándar) de las variables de crecimiento, según aislamiento bacteriano aplicado.

TRATAMIENTO	CÓDIGO AISLAMIENTO	PESO FRESCO RAÍZ (g)	PESO FRESCO FOLLAJE (g)	PESO SECO FOLLAJE (g)	ALTURA (cm)	N° HOJAS	DIÁMETRO PSEUDOTALLO (cm)
1	SER-35	16,1 \pm 1,9	86,1 \pm 3,9	5,0 \pm 0,3	23,0 \pm 0,9	6,9 \pm 0,3	18,5 \pm 0,6
2	SR-23	17,5 \pm 1,9	97,3\pm3,9	5,5 \pm 0,3	25,6\pm0,9	7,6\pm0,3	19,7 \pm 0,6
3	R-15B	13,2 \pm 3,2	81,7 \pm 6,3	4,7 \pm 0,5	23,0 \pm 1,5	6,7 \pm 0,5	18,4 \pm 0,9
4	SER-132	21,3 \pm 2,2	89,7 \pm 4,5	5,4 \pm 0,4	23,5 \pm 1,1	7,3 \pm 0,4	20,4\pm0,6
5	SER-246	16,8 \pm 2,4	89,1 \pm 4,9	5,1 \pm 0,4	24,4 \pm 1,2	7,6\pm0,4	19,1 \pm 0,7
6	SER-173	16,8 \pm 3,9	87,8 \pm 7,8	5,5 \pm 0,7	24,5 \pm 1,9	6,5 \pm 0,6	20,1 \pm 1,1
7	SER-26	19,4 \pm 1,8	96,7\pm3,7	5,7 \pm 0,3	26,6\pm0,9	7,0 \pm 0,3	19,7 \pm 0,5
8	SR-05	22,9\pm1,9*	94,4 \pm 3,9	5,9\pm0,3	24,9 \pm 0,9	7,6\pm0,3	20,6\pm0,6
9	SER-217	28,6\pm2,7*	96,5 \pm 5,5	6,4\pm0,5	22,8 \pm 1,3	6,8 \pm 0,4	20,9\pm0,8
10	SER-23	23,3\pm2,2*	91,0 \pm 4,5	5,9\pm0,4	22,0 \pm 1,1	7,0 \pm 0,4	20,3 \pm 0,6
11	R-13	19,9 \pm 1,9	98,0\pm3,9	5,6 \pm 0,3	25,5\pm0,9	7,4 \pm 0,3	20,3 \pm 0,6
12	SER-25	16,8 \pm 1,8	93,3 \pm 3,7	5,2 \pm 0,3	24,9 \pm 0,9	7,2 \pm 0,3	19,0 \pm 0,5
13	SR-62	16,3 \pm 1,8	90,4 \pm 3,7	5,3 \pm 0,3	24,7 \pm 0,9	7,1 \pm 0,3	19,5 \pm 0,5
14	SER-80	17,4 \pm 2,1	94,2 \pm 4,2	5,3 \pm 0,4	25,1 \pm 1,0	7,0 \pm 0,3	19,3 \pm 0,6
15	SER-10	16,6 \pm 1,8	89,6 \pm 3,7	5,0 \pm 0,3	24,2 \pm 0,9	6,7 \pm 0,3	19,6 \pm 0,5
16	SR-87	16,7 \pm 1,8	90,5 \pm 3,7	5,2 \pm 0,3	24,6 \pm 0,9	7,3 \pm 0,3	19,4 \pm 0,5
17	SER-222	20,8 \pm 1,9	92,0 \pm 3,9	5,7 \pm 0,3	23,9 \pm 0,9	7,0 \pm 0,3	20,1 \pm 0,6
18	B-72	14,3 \pm 1,8	87,1 \pm 3,7	5,1 \pm 0,3	25,4 \pm 0,9	7,1 \pm 0,3	19,6 \pm 0,5
19	SER-106	18,0 \pm 1,9	94,4 \pm 3,9	5,5 \pm 0,3	23,9 \pm 0,9	6,9 \pm 0,3	19,4 \pm 0,6
20	SR-12	19,9 \pm 2,1	92,6 \pm 4,2	5,5 \pm 0,4	24,4 \pm 1,0	6,9 \pm 0,3	19,8 \pm 0,6
21	TEST. COM.	20,5 \pm 1,9	91,2 \pm 3,9	5,6 \pm 0,3	22,8 \pm 0,9	7,6\pm0,3	19,8 \pm 0,6
22	TEST. ABS.	16,2 \pm 1,9	84,7 \pm 3,9	5,3 \pm 0,3	23,5 \pm 0,9	7,5 \pm 0,3	18,4 \pm 0,6
23	TEST. NEMA.	15,0 \pm 1,7	82,8 \pm 3,5	5,1 \pm 0,3	22,9 \pm 0,8	7,2 \pm 0,3	18,1 \pm 0,5
Pr>F		0,0025	0,2909	0,4967	0,1692	0,6391	0,0935

Con asterisco (*) se indican los tratamientos que presentaron diferencias significativas respecto a TESTNEMA, según prueba de Dunnett ($Pr<0,05$). Con negrita se indican los tres mejores tratamientos con bacterias para cada variable.

Las figuras 25 a 30 muestran gráficamente en orden decreciente, el promedio de las diferentes variables de crecimiento, según el tratamiento aplicado.

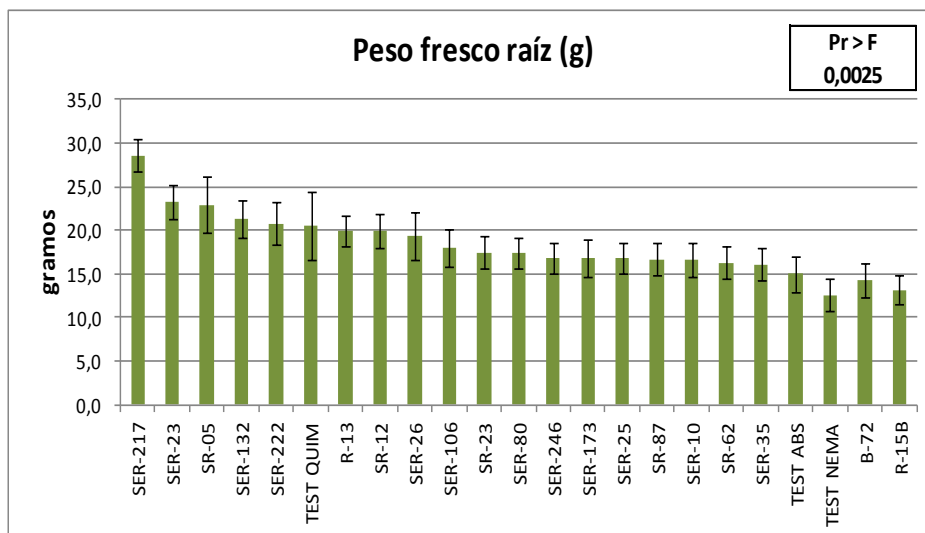


Figura 25. Peso fresco de raíz (\pm error estándar) según tratamiento aplicado. Los aislamientos SER-217, SER-23 y SR-05 presentaron diferencias estadísticas respecto a TESTNEMA ($Pr < 0,05$), según prueba de Dunnett.

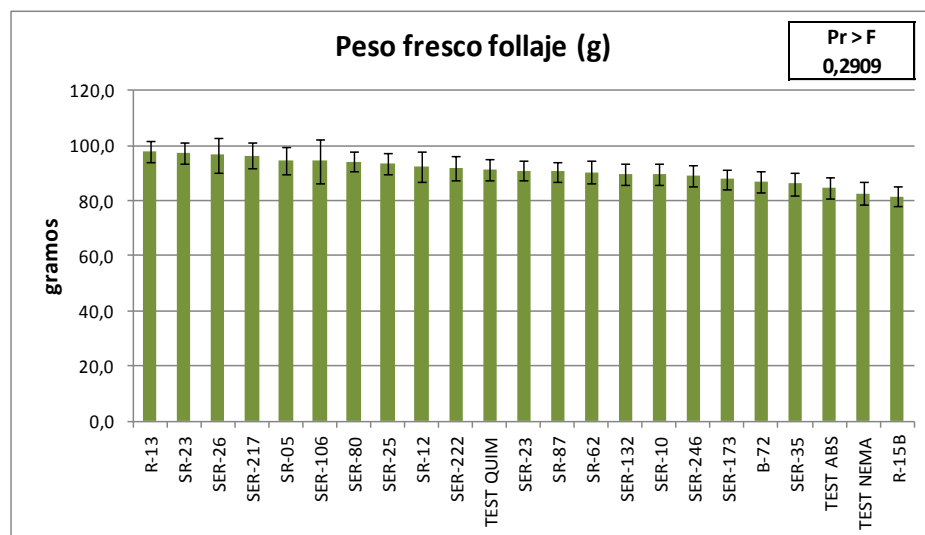


Figura 26. Peso fresco de follaje (\pm error estándar) según tratamiento aplicado. No se presentaron diferencias estadísticas entre tratamientos.

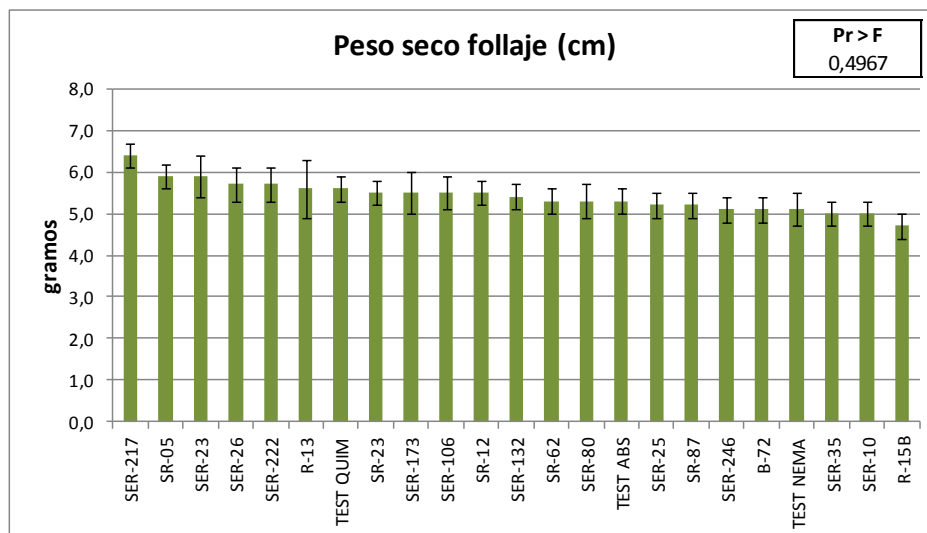


Figura 27. Peso seco de follaje (\pm error estándar) según tratamiento aplicado. No se presentaron diferencias estadísticas entre tratamientos.

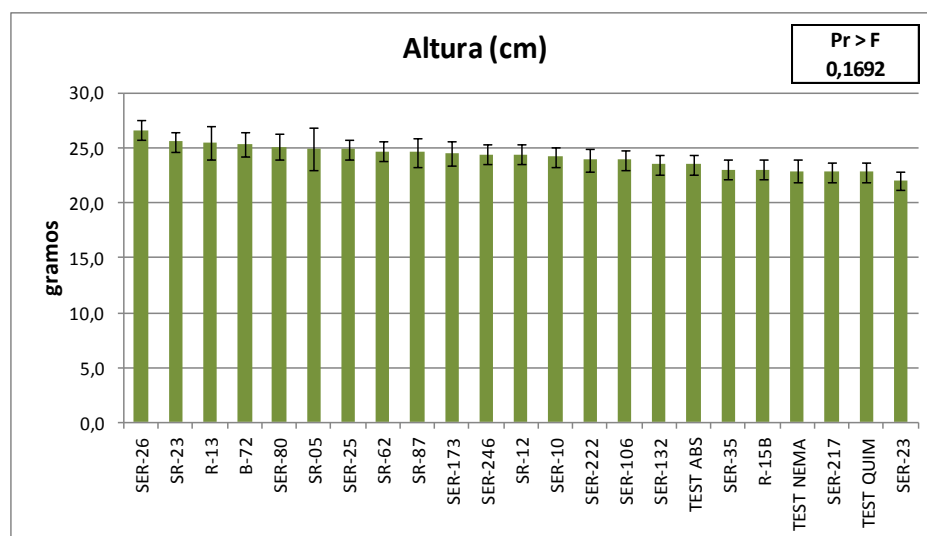


Figura 28. Altura de la planta (\pm error estándar) según tratamiento aplicado. No se presentaron diferencias estadísticas entre tratamientos.

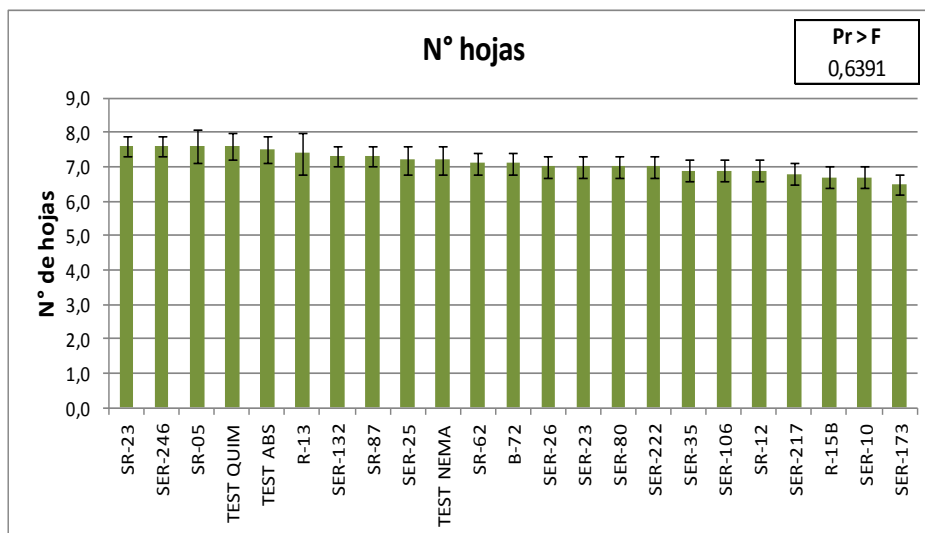


Figura 29. Número de hojas (\pm error estándar) según tratamiento aplicado. No se presentaron diferencias estadísticas entre tratamientos.

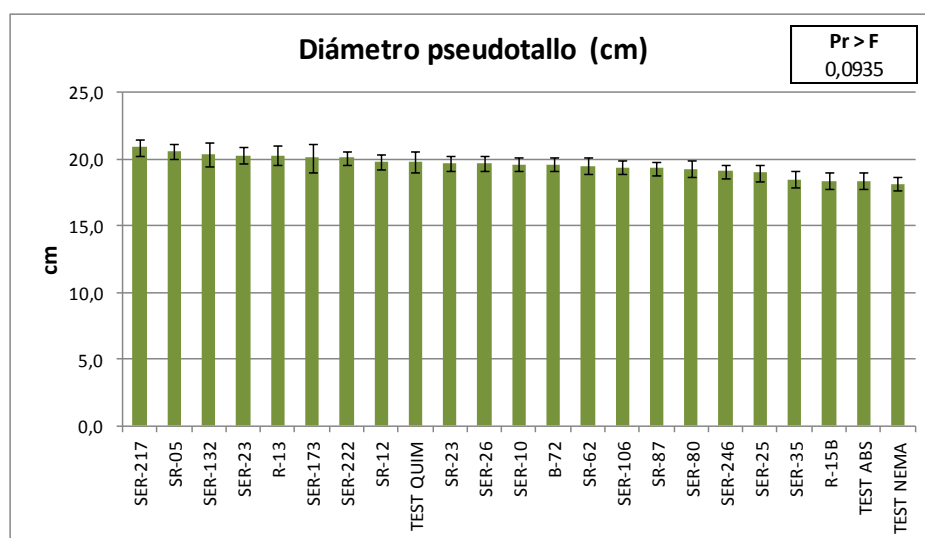


Figura 30. Diámetro del pseudotallo (\pm error estándar) según tratamiento aplicado. No se presentaron diferencias estadísticas entre tratamientos.

El cuadro 26 muestra de manera porcentual el incremento (números positivos) o disminución (números negativos) en el peso de la raíz, como resultado de la aplicación de los diferentes tratamientos, respecto al promedio alcanzado por

TESTNEMA. Aquellos tratamientos que difirieron estadísticamente, es decir, SER-217, SER-23 y SR-05, mostraron incrementos promedio del 90,7%, 55,3% y 52,7%, respectivamente. El resto de los aislamientos excepto B-72 y R-15B, también incrementaron el peso de la raíz respecto a TESTNEMA, aunque sin diferir significativamente de éste.

Cuadro 26. Porcentaje de incremento o de reducción de las variables de crecimiento según tratamiento aplicado, respecto al promedio alcanzado por TEST NEMA.

TRATAMIENTO N°	CÓDIGO AISLAMIENTO	INCREMENTO (%)
9	SER.217	90,7*
10	SER-23	55,3*
8	SR-05	52,7*
4	SER-132	42,0
17	SER-222	38,7
21	TEST COM	36,7
11	R-13	32,7
20	SR-12	32,7
7	SER-26	29,3
19	SER-106	20,0
2	SR-23	16,7
14	SER-80	16,0
5	SER-246	12,0
6	SER-173	12,0
12	SER-25	12,0
16	SR-87	11,3
15	SER-106	10,7
13	SR-62	8,7
22	TEST ABS	8,0
1	SER-35	7,3
23	TEST NEMA	0,0
18	B-72	-4,7
3	R-15B	-12,0

Con el objeto de identificar a los aislamientos que podrían tener el mayor potencial de promoción de crecimiento vegetal, se contabilizó el número de veces en que cada uno de ellos figuró en los primeros tres puestos dentro de cada variable. En ese sentido, el cuadro 27 muestra que el aislamiento SR-05

(*B. mycoides*) figuró cuatro veces (dos segundas y dos terceras posiciones), SR-23 (no identificado), SER-217 (no identificado) y R-13 (*B. thuringiensis*) figuraron 3 veces cada uno, SER-26 (*B. pumilus*) y SER-23 (no identificado) dos veces cada uno y SER-132 y SER-246 (ambos *B. thuringiensis*), una vez cada uno.

Cuadro 27. Aislamientos que clasificaron entre las tres mejores posiciones en cuanto a variables de crecimiento vegetativo.

TRATAMIENTO	CÓDIGO DE AISLAMIENTO	POSICIÓN SEGÚN VARIABLE DE CRECIMIENTO						N° DE CLASIFICACIONES
		PESO FRESCO RAÍZ	PESO FRESCO FOLLAJE	PESO SECO FOLLAJE	ALTURA	N° HOJAS	DIÁMETRO PSEUDOTALLO	
2	SR-23		2		2	2		3
4	SER-132						3	1
5	SER-246					1		1
7	SER-26		3		1			2
8	SR-05	3*		3		2	2	4
9	SER-217	1*		1			1	3
10	SER-23	2*		2				2
11	R-13		1		3	2		3

El asterisco (*) se indica que los tratamientos presentaron diferencias estadísticas para la variable peso fresco de raíz, respecto a TESTNEMA.

Bacillus y *Pseudomonas* son los dos géneros de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés) que más ampliamente han sido relacionados a la promoción de crecimiento. De acuerdo al modo de acción, las PGPR se dividen en dos grupos: las que tienen un efecto indirecto sobre la promoción de crecimiento, que básicamente son microorganismos biocontroladores, y las que tienen un efecto directo a través de la producción de fitohormonas, la solubilización de fosfatos, el incremento en la absorción de hierro y la producción de sustancias volátiles (Rao-Podile y Krishna-Kishore 2006).

El efecto promotor de diferentes especies de *Bacillus* según Lodewyckx et al. (2002) y Rao-Podile y Krishna-Kishore (2006), ha sido asociado al parasitismo mediante la producción de enzimas líticas (*B. subtilis*), a la inhibición en la

producción de enzimas y toxinas (*B. megaterium*), a la resistencia sistémica inducida (*B. subtilis*), a la solubilización de fosfatos (*Bacillus* sp) y a la producción de volátiles (*B. subtilis* y *B. amyloliquifaciens*).

Bargabus et al. (2002), encontraron en experimentos en vivero y campo, que *B. mycooides* disminuyó entre un 38 y 91% la severidad de la mancha por *Cercospora* (*Cercospora beticola* Sacc.) en remolacha (*Beta vulgaris*), lo cual fue atribuido a un aumento en la actividad de quitinasas, β -1,3-glucanasa y de peroxidasas. Tal como se señaló, la resistencia sistémica inducida es un mecanismo indirecto de promoción de crecimiento.

En el experimento se observó diferencias significativas únicamente en el peso de raíz por el efecto de los aislamientos SER-217, SER-23 y SR-05. Los dos primeros no pudieron ser identificados, mientras que el tercero fue identificado como *B. mycooides*, respectivamente.

La promoción de crecimiento de plantas de banano en estudios de control biológico de *Radopholus similis*, mediante la infección previa con hongos endofíticos como *Fusarium oxysporum* (razas no patogénicas) y *Trichoderma atroviridae*, ha sido ampliamente informada en vivero (Sikora y Pocasangre 2004, Pocasangre et al. 2004, zum Felde et al. 2005, Paparu et al. 2009 y en menor grado, en fincas bananeras comerciales con una manejo convencional con agroquímicos (Pocasangre et al. 2006). Debido a la reducción de la infección y de la reproducción de los nematodos, el efecto de promoción observado, fue explicado por una mayor sanidad del sistema radical (Pocasangre et al. 2006).

En el ámbito de las bacterias, hay también numerosos reportes que señalan el efecto de promoción de crecimiento de las plantas por parte de estos microorganismos (Lodewyckx et al. 2002); e igualmente este efecto se reporta en estudios de combate biológico de nematodos (Siddiqui y Mahmood 1999, Tian et al. 2007, Terefe et al. 2009, Siddiqui et al. 2009 y Timper 2011).

Diferentes mecanismos como la fijación biológica de nitrógeno, la solubilización de elementos químicos como el fósforo, la producción de sideróforos y de fitohormonas, y la mayor sanidad radical, son los principales factores que explican este efecto (Lodewickx et al. 2002, Siddiqui et al. 2009, Terefe et al. 2009, Vetrivelkalai et al. 2010).

Por el contrario, en experimentos de combate de nematodos, son pocos los estudios que han demostrado promoción de crecimiento de vitroplantas de banano por parte de una bacteria en particular. Uno de ellos fue realizado por Jonathan y Umamaheswari (2006), quienes utilizando un aislamiento de *Bacillus firmus*, encontraron diferencias significativas en cuanto a la altura de la planta, peso fresco de la parte aérea, largo y peso fresco de la raíz en vitroplantas de banano del cultivar Robusta.

Se ha también reportado la promoción de crecimiento en plantas de banano con la misma bacteria (*B. firmus*), pero en combinación con sustratos orgánicos y otros microorganismos como *Fusarium oxysporum*, *Paecilomyces lilacinus* y *Streptomyces costarricanus* (Esnard et al. 1998 y Mendoza y Sikora 2008).

En resumen, es posible que alguno o varios de los factores bióticos y abióticos señalados, haya afectado la colonización de las bacterias o su actividad biológica, reduciendo en alguna medida el potencial de promoción de crecimiento, el cual solo se evidenció a nivel radical.

4.5.4 Efecto de los tratamientos sobre la reproducción de los nematodos.

Al analizar las cantidades de nematodos presentes en la raíz de las plantas tratadas, con respecto a TESTNEMA, únicamente se encontraron diferencias estadísticas con el testigo químico (Vydate®), para las cantidades de nematodos totales ($P=0,0180$) y de *Radopholus similis* ($P=0,0111$). Porcentualmente el control alcanzado por este producto alcanzó el 72,4% respecto a TESTNEMA.

El cuadro 28 muestra el número promedio de nematodos en 100g de raíz según tratamiento y la probabilidad estadística en cada caso. Resaltado con asterisco se indica el tratamiento que difirió estadísticamente de TESTNEMA y en negrita, los tres mejores tratamientos.

Cuadro 28. Promedio (\pm error estándar) del número de nematodos presente en 100g de raíz, según aislamiento bacteriano aplicado.

TRAT.	CÓDIGO AISLAMIENTO	CANTIDAD DE NEMATODOS									
		TOTALES		<i>Radopholus similis</i>		<i>Helicotylenchus</i> sp		<i>Meloidogyne</i> sp		<i>Pratylenchus</i> sp	
		100g raíz	LN	100g raíz	LN	100g raíz	LN	100g raíz	LN	100g raíz	LN
1	SER-35	56.532	10,9\pm0,2	53.254	10,9\pm0,2	3.200	8,1 \pm 0,4	-	-	78	4,4 \pm 1,7
2	SR-23	64.739	11,1 \pm 0,2	60.144	11,0 \pm 0,2	4.503	8,4 \pm 0,4	-	-	92	4,5 \pm 1,6
3	R-15B	91.424	11,4 \pm 0,3	82.527	11,3 \pm 0,3	8.128	9,0 \pm 0,5	-	-	769	6,6 \pm 1,9
4	SER-132	66.996	11,1 \pm 0,2	61.205	11,0 \pm 0,2	5.431	8,6 \pm 0,4	145	5,0 \pm 2,5	214	5,4 \pm 1,7
5	SER-246	86.904	11,4 \pm 0,2	80.088	11,3 \pm 0,2	5.608	8,6 \pm 0,5	227	5,4 \pm 2,7	980	6,9 \pm 1,8
6	SER-173	120.113	11,7 \pm 0,2	113.572	11,6 \pm 0,2	5.398	8,6 \pm 0,5	-	-	1.143	7,0 \pm 1,8
7	SER-26	65.174	11,1 \pm 0,2	58.806	11,0 \pm 0,2	6.248	8,7 \pm 0,4	-	-	120	4,8 \pm 1,6
8	SR-05	70.397	11,2 \pm 0,2	67.070	11,1 \pm 0,2	2.951	8,0\pm0,4	140	4,9 \pm 2,4	237	5,5 \pm 1,6
9	SER-217	61.973	11,0\pm0,3	56.830	10,9\pm0,3	4.874	8,5 \pm 0,5	-	-	269	5,6 \pm 1,9
10	SER-23	60.354	11,0\pm0,2	56.561	10,9\pm0,2	3.641	8,2\pm0,4	-	-	152	5,0 \pm 1,7
11	R-13	82.305	11,3 \pm 0,2	78.197	11,3 \pm 0,2	3.736	8,2 \pm 0,4	45	3,8\pm2,4	327	5,8 \pm 1,6
12	SER-25	89.927	11,4 \pm 0,2	84.031	11,3 \pm 0,2	5.556	8,6 \pm 0,4	-	-	339	5,8 \pm 1,7
13	SR-62	100.718	11,5 \pm 0,2	94.037	11,5 \pm 0,2	6.048	8,7 \pm 0,4	233	5,4 \pm 2,4	400	6,0 \pm 1,6
14	SER-80	69.880	11,2 \pm 0,2	63.252	11,1 \pm 0,2	6.026	8,7 \pm 0,5	112	4,7\pm2,7	490	6,2 \pm 1,8
15	SER-10	77.253	11,3 \pm 0,2	70.874	11,2 \pm 0,2	5.347	8,6 \pm 0,4	137	4,9 \pm 2,5	895	6,8 \pm 1,7
16	SR-87	74.886	11,2 \pm 0,2	68.991	11,1 \pm 0,2	5.721	8,7 \pm 0,4	-	-	173	5,2 \pm 1,6
17	SER-222	64.157	11,1 \pm 0,2	60.371	11,0 \pm 0,2	3.741	8,2 \pm 0,4	-	-	44	3,8\pm1,7
18	B-72	115.692	11,6 \pm 0,2	111.206	11,6 \pm 0,2	4.296	8,4 \pm 0,4	189	5,2 \pm 2,4	-	-
19	SER-106	78.438	11,3 \pm 0,2	73.086	11,2 \pm 0,2	4.830	8,5 \pm 0,4	201	5,3 \pm 2,5	321	5,8 \pm 1,7
20	SR-12	67.082	11,1 \pm 0,2	62.199	11,0 \pm 0,2	4.814	8,5 \pm 0,4	69	4,2\pm2,5	-	-
21	TEST. COM.	18,614*	9,8 \pm 0,2	16,520*	9,7 \pm 0,2	1.956	7,6 \pm 0,4	-	-	139	4,9 \pm 1,7
22	TEST. ABS.	63.740	11,1 \pm 0,2	58.647	11,0 \pm 0,2	4.667	8,4 \pm 0,4	-	-	426	6,1 \pm 1,6
23	TEST. NEMA.	67.497	11,1 \pm 0,2	61.665	11,0 \pm 0,2	5.388	8,6 \pm 0,4	149	5,0 \pm 2,4	294	5,7 \pm 1,6
	Pr>Chi	-	0,0180	-	0,0111	-	0,9930	-	0,9998	-	0,9998

Con asterisco (*) se indican los tratamientos que presentaron diferencias significativas respecto a TESTNEMA, según prueba de Dunnett (Pr<0,05). Con negrita se indican los tres mejores tratamientos con bacterias para cada variable.

Debido a que 12 de los tratamientos no reportaron la presencia de *Meloidogyne* sp y dos no reportaron la de *Pratylenchus* sp, lo cual posiblemente fue debido a su escasa población inicial en el suelo de las macetas (cuadro 29) y no al efecto patogénico de los tratamientos, el análisis estadístico fue aplicado únicamente para aquellos que sí reportaron la presencia de estos nematodos. No obstante, ninguno de estos tratamientos, incluyendo al testigo químico, mostró diferencias estadísticas respecto a TESTNEMA.

Cuadro 29. Número inicial de nematodos (previo a inoculación de *Radopholus similis*) presentes en 250g de suelo de siembra luego de su homogenización.

No. MUESTRA	<i>Radopholus similis</i>	<i>Helicotylenchus</i> sp	<i>Meloidogyne</i> sp	<i>Pratylenchus</i> sp	Nematodos totales
1	0	0	0	0	0
2	2	2	1	0	5
3	2	3	0	0	5
4	1	4	0	0	5
5	4	5	1	1	11
6	3	3	0	0	6
Promedio	2,0	2,8	0,3	0,2	5,3

Las figuras 31 a 35 muestran de manera creciente, el LN de los promedios de nematodos totales y de nematodos según especie, presentes en 100g de raíz, incorporando el error estándar en cada caso.

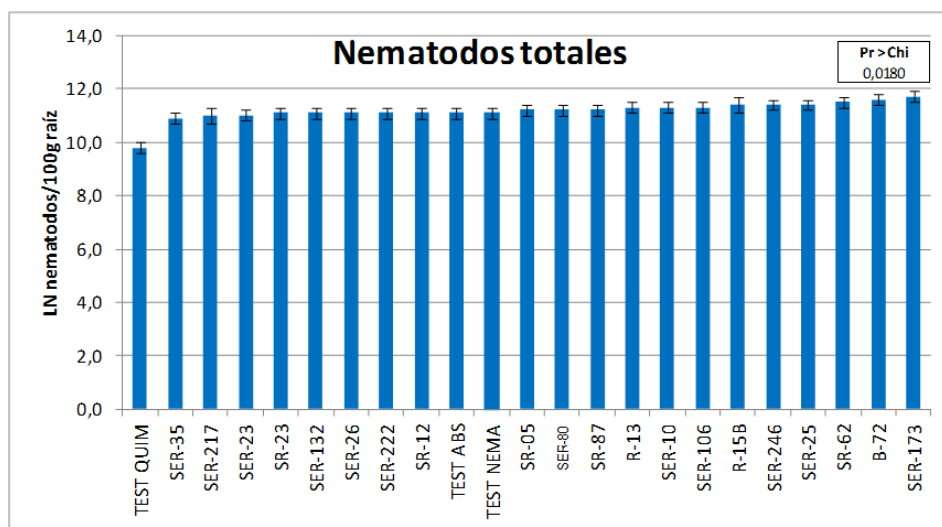


Figura 31. Logaritmo Natural del número de nematodos totales (\pm error estándar) en 100g de raíz, según tratamiento aplicado. El testigo químico mostró diferencias estadísticas respecto a TESTNEMA, según prueba de Dunnett ($P=0,0180$).

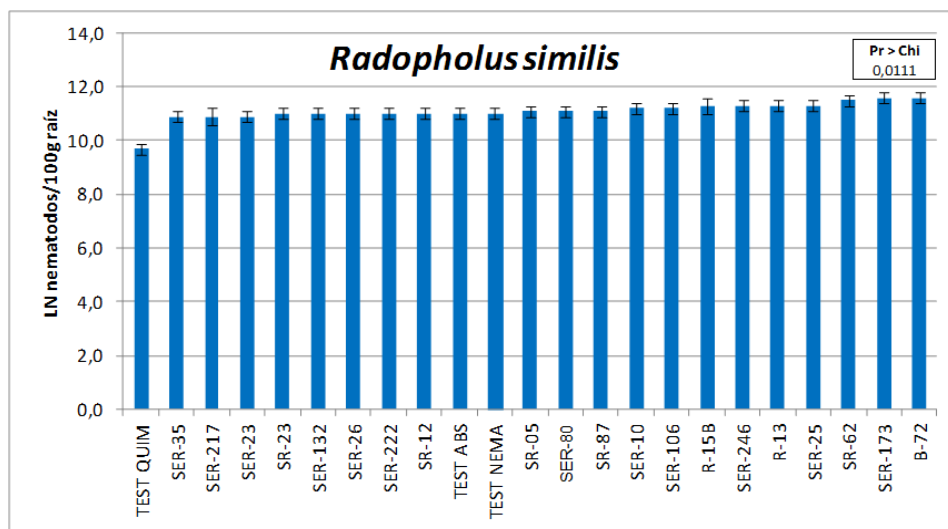


Figura 32. Número de *Radopholus similis* en 100g de raíz (\pm error estándar), según tratamiento aplicado. Se presentaron diferencias estadísticas respecto a TESTNEMA, para el testigo químico ($P=0,0111$).

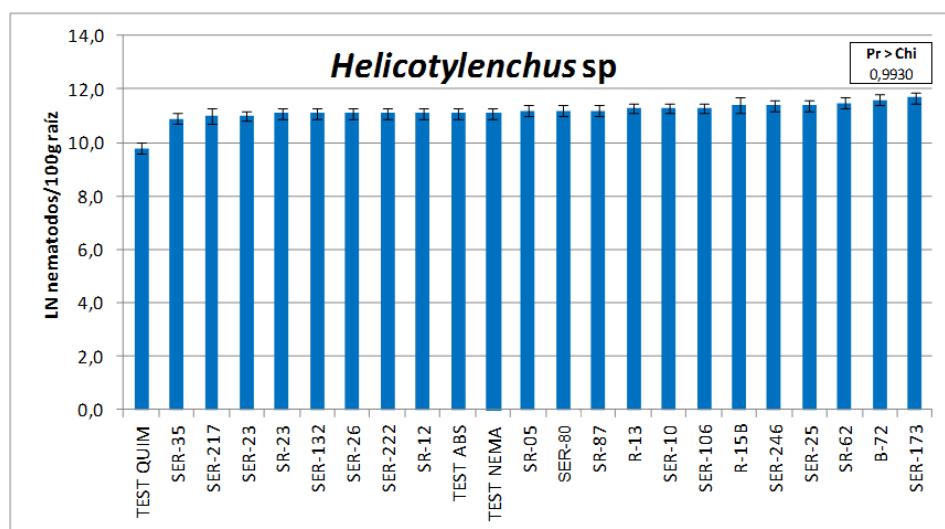


Figura 33. Número de *Helicotylenchus sp* en 100g de raíz (\pm error estándar), según tratamiento aplicado. No se presentaron diferencias estadísticas entre tratamientos ($P=0,9930$).

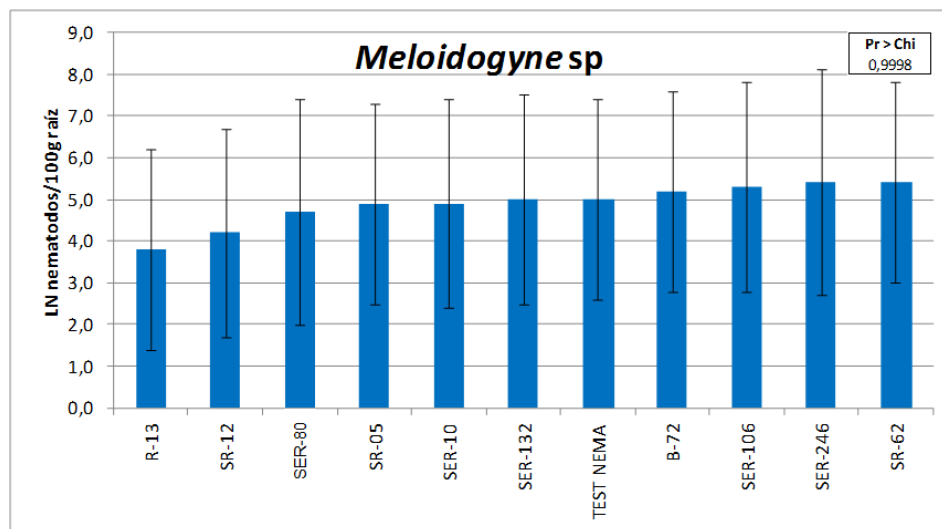


Figura 34. Cantidad de *Meloidogyne sp* en 100g de raíz (\pm error estándar), según tratamiento aplicado. No se presentaron diferencias estadísticas respecto a TESTNEMA ($P=0,9998$).

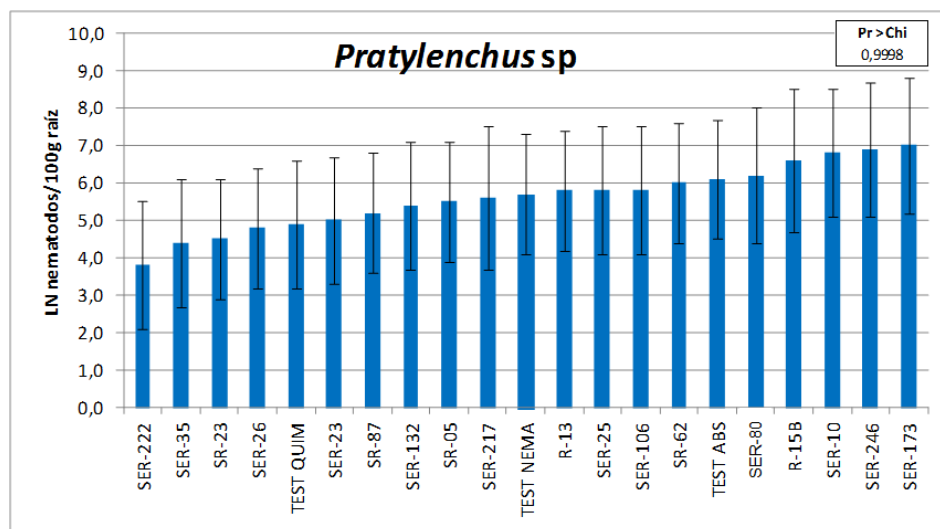


Figura 35. Cantidad de *Pratylenchus sp* en 100g de raíz (\pm error estándar), según tratamiento aplicado. No se presentaron diferencias estadísticas respecto a TESTNEMA ($P=0,9998$).

Con el objeto de identificar a los aislamientos que sin mostrar diferencias estadísticas con TESTNEMA, exhibieron cierto potencial de reducción de la cantidad de nematodos, se contabilizó el número de veces en que cada uno de ellos figuró en los primeros tres puestos dentro de cada variable. En ese sentido, el cuadro 30 muestra que el aislamiento SER-35 (*B. thuringiensis*) figuró cuatro veces (dos primeros y dos segundos lugares), SER-23 (no identificado) figuró tres veces (dos segundos y un tercer lugar), SER-217 (no identificado) figuró dos veces (dos terceros lugares), mientras que SR-23 (no identificado), SR-05 (*B. mycooides*), R-13 (*B. thuringiensis*), SER-80 (*B. pumilus*), SER-222 (*B. thuringiensis*) y SR-12 (*B. thuringiensis*), figuraron en una ocasión en diferentes posiciones.

Cuadro 30. Aislamientos que clasificaron entre las tres mejores posiciones en cuanto a la reproducción de los nematodos.

TRATAMIENTO	CÓDIGO DE AISLAMIENTO	POSICIÓN SEGÚN CANTIDAD DE NEMATODOS/100g DE RAÍZ.					N° DE CLASIFICACIONES
		NEMATODOS TOTALES	<i>R. similis</i>	<i>Helicotylenchus</i> sp	<i>Meloidogyne</i> sp	<i>Pratylenchus</i> sp	
1	SER-35	1	1	2		2	4
2	SR-23					3	1
8	SR-05			1			1
9	SER-217	3	3				2
10	SER-23	2	2	3			3
11	R-13				1		1
14	SER-80				3		1
17	SER-222					1	1
20	SR-12				2		1

El asterisco (*) se indica que los tratamientos presentaron diferencias estadísticas para la variable peso fresco de raíz, respecto a TESTNEMA.

4.5.5 Efecto de los tratamientos agrupados según origen (SER, SR, R), sobre las variables de Crecimiento Vegetativo y Control de Nematodos.

Al analizar el efecto del tipo de muestra de la cual fueron aisladas las bacterias (raíz, suelo extrarrizoférico o suelo rizoférico), no se encontraron diferencias

estadísticas en cuanto a las variables de crecimiento vegetativo y de presencia de nematodos en la raíz de las plantas. Por tal razón, para el número de muestras analizadas de cada tipo de muestra, se puede decir que el origen, o bien, la naturaleza endofítica, epifítica o saprofítica de las bacterias inoculadas, no fue un factor determinante para promover el crecimiento de las plantas ni para ejercer afectar la infección y reproducción de los nematodos. Los cuadros 31 y 32 muestran los promedios alcanzados por los tratamientos de forma agrupada según su origen, para las variables de crecimiento y de contenido de nematodos en la raíz.

Cuadro 31. Promedio (\pm error estándar) de las variables de crecimiento, alcanzado grupalmente de acuerdo al origen de los aislamientos.

ORIGEN DEL AISLAMIENTO	VARIABLES DE CRECIMIENTO					
	Peso Fresco de Raíz (g)	Peso Fresco de Follaje (g)	Peso Seco de Follaje (g)	Altura (cm)	N° de Hojas	Diámetro del Pseudotallo (cm)
Raíz (n=3)	17,8 \pm 1,4	93,8 \pm 2,6	5,3 \pm 0,2	24,9 \pm 0,6	7,1 \pm 0,2	19,6 \pm 0,4
SER (n=11)	19,1 \pm 0,7	91,7 \pm 1,3	5,4 \pm 0,1	24,1 \pm 0,3	7,0 \pm 0,1	19,6 \pm 0,2
SR (n=5)	18,5 \pm 0,9	92,9 \pm 1,7	5,5 \pm 0,1	24,8 \pm 0,4	7,3 \pm 0,1	19,8 \pm 0,2
Contrast	Pr > F					
RAIZ-SER	0,3964	0,4728	0,6561	0,2340	0,6194	0,9616
RAIZ-SR	0,6537	0,7833	0,6352	0,8824	0,3926	0,6906
SR-SER	0,6210	0,5686	0,9299	0,1643	0,0572	0,6079

Cuadro 32. Promedio (\pm error estándar) del Logaritmo Natural de la cantidad de nematodos en 100g de raíz, alcanzado grupalmente de acuerdo al origen de los aislamientos.

ORIGEN DEL AISLAMIENTO	LOGARITMO NATURAL DEL NÚMERO DE NEMATODOS EN 100g DE RAÍZ				
	<i>Radopholus similis</i>	<i>Helicotylenchus sp</i>	<i>Meloidogyne sp</i>	<i>Pratylenchus sp</i>	NEMATODOS TOTALES
Raíz (n=3)	11,2 \pm 0,1	8,6 \pm 0,3	4,0 \pm 2,2	6,2 \pm 1,1	11,3 \pm 0,1
SER (n=11)	11,1 \pm 0,1	8,5 \pm 0,1	4,2 \pm 1,1	6,0 \pm 0,5	11,2 \pm 0,1
SR (n=5)	11,2 \pm 0,1	8,5 \pm 0,2	4,5 \pm 1,6	5,2 \pm 0,8	11,2 \pm 0,1
Contrast	Pr > ChiSq				
RAIZ-SER	0,6688	0,6109	0,9413	0,8463	0,6400
RAIZ-SR	0,7662	0,6029	0,8551	0,4276	0,7187
SR-SER	0,8979	0,9357	0,8646	0,4301	0,9273

El producto Vydate® (nombre común Oxamyl), es un insecticida-nematicida sistémico, soluble, que pertenece a la familia de los carbamatos. Su modo de acción es mediante la inhibición de la acetilcolinesterasa, una enzima que interviene en la transmisión de los impulsos nerviosos (DuPont 2003). En estudios a nivel de vivero con plantas de banano, la formulación Vydate® 24 SL (Oxamyl) se utiliza como testigo químico por su alta eficacia y consistencia en el control de *Radopholus similis* y otros nematodos del banano.

Vargas y Araya (2007), en estudios a nivel de vivero con vitroplantas de banano del cultivar Grande Naine, encontraron diferencias significativas en el número de *R. similis* y de nematodos totales presentes en la raíz cuando este producto fue aplicado, en comparación al testigo no aplicado.

En el presente estudio, este agente fue el único que difirió significativamente de TESTNEMA, tanto en el número de nematodos totales ($P=0,0180$), como en el número de *Radopholus similis* ($P=0,0111$) en 100g de raíz, lo cual es congruente con lo mencionado anteriormente.

Tal como se ha informado, existe un amplio conocimiento acerca del potencial de las bacterias para controlar nematodos. Siddiqui y Mahmood (1999) y Tian et al. (2007) en sus revisiones sobre este tema, reportan no menos de 30 géneros con esta propiedad. De todo este grupo, únicamente *P. penetrans* es considerada como parasítica estrictamente hablando; el resto, se trata de bacterias no parasíticas, dentro de las cuales *Bacillus* y *Pseudomonas*, se han descrito como los géneros con mayor potencial (Tian et al. 2007).

Se ha descrito actividad antagónica de *B. thuringiensis* hacia *Heterodera glycines*, *Caenorhabditis elegans*, *Meloidogyne incognita*, *Panagrellus redivivus*, a través de la producción de cristales proteicos tóxicos (Noel 1990, Chen 2000, Márquez y Fernández 2006, Salehi Jouzani et al. 2008) y mediante la actividad de proteínas líticas (Quiuhong et al. 2006). *B. firmus*, *B. nematocida*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. cereus* y *B. lincheniformis*, han sido reportados afectando a *M. incognita*, *M. hapla*, *Ditylenchus dipsaci*, *Radopholus*

similis, *Pratylenchus coffeae*, *Helicotylenchus multicinctus*, *Heterodera* spp, *Tylenchus semipenetrans* y *Xiphinema index*, a través de la producción de enzimas de defensa relacionadas a la resistencia sistémica inducida y otras sustancias extracelulares como metabolitos secundarios, proteasas, quitinasas y colagenasas (Wei et al. 2003, Mendoza, et al. 2008, Terefe et al. 2009, Jonathan y Umamaheswari 2006, Quihong et al. 2006, Vargas y Araya 2007).

Bacillus mycoides ha sido en menor grado asociada al control de nematodos. Insunza et al. (2002), encontraron en experimentos de vivero con plantas de papa (*Solanum tuberosum*), tanto promoción de crecimiento, como reducciones entre 50 y 100% de la densidad de población de los nematodos *Paratrichodorus pachydermus* y *Trichodorus primitivus*, ambos catalogados como vectores del virus del cascabel del tabaco (tobacco rattle virus), como resultado de la inoculación de las bacterias rizosféricas *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus mycoides*, *Pseudomonas* sp y de una bacteria que no fue identificada. Rae et al. (2010), en estudios de laboratorio, encontraron efecto nematocida de *B. cereus*, *B. weihenstephanensis*, *B. mycoides* and *Bacillus* sp, sobre los nematodos *Caenorhabditis elegans* (bacteriófago) y *Pristionchus pacificus* (omnívoro) que alcanzó entre el 70 y el 100% a los 5 días de exposición con las bacterias.

Según la identificación proveniente de la comparación con secuencias depositadas en la base de datos NBI, en el estudio se identificaron 5 de las especies señaladas con efecto nematocida: *B. thuringiensis*, *B. pumilus*, *B. mycoides*, *B. subtilis* y *B. cereus*.

En el presente estudio, sin mostrar diferencias significativas respecto a TESTNEMA, 8 aislamientos redujeron la densidad de nematodos totales en la raíz de las plantas, siendo SER-35 (*B. thuringiensis*), SER-23 (no identificado) y SER-217 (no identificado), los de mayor eficacia. Por el contrario, 12 aislamientos incrementaron la cantidad de nematodos. La baja eficacia como se discutirá más adelante, pudo deberse a múltiples factores tales como las características del suelo; su no esterilización; la variedad de banano utilizada y

su estado fenológico, en función de la cantidad y el tipo de los exudados que emite; la madurez del cultivo bacteriano, su proporción de células vegetativas y de endósporas; así como el tiempo transcurrido entre la inoculación de la bacteria y la de los nematodos y el tiempo transcurrido entre la primera aplicación de las bacterias y la cosecha. No se descarta un bajo potencial intrínseco de cada bacteria para competir y colonizar la rizósfera y la endorriza y para brindar el efecto supresivo, ni que las condiciones experimentales no fueron favorables para que expresara su potencial.

Weller et al. (1985), citado por Siddiqui y Mahmood (1999), señalan que para obtener aislados efectivos, el aislamiento de las bacterias debe de hacerse del mismo lugar en el cual va a ser utilizados.

Usar o no suelo estéril en estudios a nivel de vivero podría ser un factor importante en el efecto de los microorganismos que se evalúan. Por ejemplo, Padgham y Sikora (2007) encontraron reducciones del 40% en el número de formación de agallas producidas por *Meloidogyne graminícola*, al inocular plantas de arroz de 3 semanas de edad, sembradas en una mezcla estéril de arena y suelo (2:1), con una cepa de *Bacillus megaterium*.

En estudios realizados con hongos endofíticos (*Fusarium oxysporum* y *Trichoderma atroviridae*) para incrementar la supresividad a *Radopholus similis* de vitroplantas de banano sembradas en suelo estéril, se han encontrado consistentemente, tanto una menor infección y reproducción del nematodo, como una respuesta positiva en el crecimiento vegetativo (Pocasangre et al. 2000, Pocasangre et al. 2004 y zum Felde et al. 2006, Athman et al. 2007, Paparu et al. 2009).

Siddiqui et al. (2009) encontró al evaluar diferentes cepas de *Bacillus* sp, respuesta positiva en la eclosión y penetración de *Meloidogyne incognita* en plantas de arveja (*Pisum sativum*) sembradas en un suelo franco arenoso estéril. Terefe et al. 2009, encontró una reducción del 91% en la formación de nódulos, del 76% en la población de *M. incognita* y del 45% en el número de

huevos en plantas de tomate sembradas en un suelo estéril, al aplicar 8g/planta de una formulación comercial de *B. firmus*.

En ese sentido, Timper (2011), señala que la mayoría de los estudios dirigidos a la evaluación de microorganismos como agentes de control de nematodos a nivel de vivero, han utilizado suelo esterilizado mediante calor o mediante fumigación, con el objeto de eliminar nematodos parasíticos y fitopatógenos residentes, y de esta forma en una primera etapa, identificar candidatos con potencial. Sin embargo, señala que esto crea una irreal expectativa de la supresión a los nematodos, puesto que el suelo parcial o completamente esterilizado, reduce la competencia, depredación, y la producción de antibióticos de los microorganismos originalmente presentes y además, por que se produce un incremento en la cantidad de sustancias orgánicas provenientes de los organismos muertos. Por lo tanto, bajo estas condiciones, se produce una restricción que amplía las posibilidades de interacción entre el antagonista y el nematodo, cosa que no sucede en el campo.

En el experimento de vivero se utilizó suelo proveniente de una finca comercial bananera y éste no fue esterilizado, por lo que las bacterias aplicadas estuvieron sometidas a todos los factores bióticos y abióticos explicados, logrando en algunos casos, promover de forma significativa el crecimiento de la raíz y en cierta magnitud, modificar positivamente otras variables de crecimiento, aunque sin diferencias estadísticas respecto a TESTNEMA.

El estado fisiológico de las bacterias utilizadas como inóculo, podría haber jugado también un papel importante. Bacterias como *B. thuringiensis* cuyo principal modo de acción se da a través de la producción de cristales protéicos tóxicos y exotoxinas, el tiempo de incubación es muy importante, ya que su síntesis y ensamblaje se da durante la fase estacionaria (Niedmann-Lolas y Meza-Basso 2006).

Con el objeto de determinar si la edad del cultivo afectaba la actividad nematicida de diferentes aislamientos de *B. thuringiensis*, Leyns et al. 1995

realizaron varios bioensayos *in vitro* tomando como inóculo cultivos de 1 hasta 9 días. Luego de 24 horas de contacto del nematodo con las mezclas de cristal y esporas, se realizaron las evaluaciones. El día uno con suspensiones de células vegetativas con un 25% de esporas, la mortalidad máxima llegó al 10%; a los dos días con un 50% de esporas, la mortalidad alcanzó un máximo del 66%. Para más de 3 días no se observaron incrementos significativos en la mortalidad.

Otros autores han informado el uso de cultivos de 2 a 3 días con resultados importantes en el control de *Meloidogyne incognita* con *Pseudomonas* sp y *Bacillus* sp (Siddiqui et al. 2009), y de *M. mayaguensis* con mezclas entre diferentes bacterias y el hongo nematófago *Arthrobotrys oligospora* (Duponnois et al. 1998).

En el presente estudio se utilizaron varias especies de *Bacillus*, pero todos los cultivos fueron incubados 24 horas a 30°C con el objeto de inocular bacterias en su fase activa, con lo cual se buscó obtener una rápida colonización y efecto sobre los nematodos.

Por otra parte, debido a que las concentraciones de las diferentes bacterias utilizadas en este estudio, estuvieron dentro del rango normal en el cual han sido evaluadas en la mayoría de experimentos consultados, se restó importancia a este factor; sin embargo, Leyns et al. (1995) pudieron demostrar en experimentos con una cepa de *B. thuringiensis* que bajo condiciones *in vitro*, se manifestaron diferencias significativas en la mortalidad de *Caenorhabditis elegans*, en función de su concentración aplicada. En sus experimentos Leyns et al. (1995) también encontró que al aumentar el pH del medio en donde se inoculó *C. elegans* y las bacterias, se presentó un aumento en la mortalidad del nematodo; y además que la temperatura no tuvo un efecto significativo dentro del rango de 4 a 46°C por espacio de 24 horas.

El uso de consorcios de microorganismos ha resultado en mayores índices de control de nematodos que cuando se evalúan de forma individual. Paparu et al.

(2009), encontraron bajo condiciones de vivero, un mejor efecto de control de *Radopholus similis* y del picudo negro (*Cosmopolites sordidus*), así como mejores índices de crecimiento vegetal, al combinar la infección de plantas de banano con dos aislamientos de *Fusarium oxysporum*, que aplicándolos forma individual. Este efecto se explicó en una mejor colonización radical cuando los aislamientos se aplicaron conjuntamente (en consorcio).

Zum Felde et al. (2009) y Sikora et al. (2010), reportan el efecto mejorador de crecimiento y de control de *R. similis* al inocular vitroplantas de banano con *F. oxysporum* en conjunto con *Trichoderma atrovoridiae*. El segundo autor resume que el uso de “cocteles” de microorganismos en lugar de microorganismos individuales podría deberse al aprovechamiento de diferentes modos de acción, al efecto sobre diferentes estadios de los nematodos, a la compatibilidad entre ellos, a que son seguros de usar y fáciles de aplicar y de incorporar dentro de los sistemas de Manejo Integrado de Plagas (MIP).

Otro factor importante a considerar para mejorar los índices de colonización y el efecto de las bacterias sobre el crecimiento de las plantas y la reproducción de los nematodos, es la formulación. Podile y Kishore (2006) señalan que los prerequisites para un escalamiento exitoso de PGPR son el desarrollo de productos viables, rentables y de formulaciones amigables para facilitar su aplicación. Además, que la habilidad de una formulación de PGPR para consistentemente liberar un número crítico de células viables, es un indicador de éxito.

Siddiqui y Mahmood (1999) indican la conveniencia de utilizar alginato de sodio y ciertos metales catiónicos como Ca^{2+} para formar geles como Ca-gluconato. Podile y Kisore (2006) informan sobre el desarrollo de formulaciones líquidas de PGPR basadas mayoritariamente en aceites vegetales como canola (rapeseed), palma aceitera y aceite de castor. Dentro de las formulaciones sólidas, señalan a la turba y a los talcos inertes.

Posiblemente habiendo utilizado algún tipo de protección para las bacterias o algún coadyuvante en este estudio, se hubiese incrementado el nivel de fijación y colonización de las bacterias aplicadas, y por tanto, se hubiese podido incrementar su potencial biológico hasta el punto de poder observar diferencias significativas respecto a TESTNEMA.

Finalmente, la inoculación artificial o el uso de suelos con presencia natural de nematodos, es otro factor a discutir. En estudios a nivel de vivero con vitroplantas de banano, con el objeto de asegurar una alta infección y colonización de las raíces, es normal la aplicación de un promedio de 500 nematodos totales (*Radopholus similis*) (Pocasangre et al. 2004, zum Felde et al. 2006, Vargas y Araya 2007 y Vargas et al. 2012).

Sin embargo, en otros estudios como los realizados por Tabarant et al. (2011), para determinar el efecto de enmiendas orgánicas sobre el crecimiento de plantas de banano (*Musa acuminata*, subgrupo Cavendish cv. Grande Naine) y sobre la reproducción de *Radopholus similis*; y por Noel (1990) para determinar el efecto de la Thuriengésina sobre *Heterodera glycinis* en vivero con plantas de soya, han utilizado la población residente del suelo de siembra.

En el estudio se aplicó un promedio de 506 nematodos totales (462,6 hembras, 43,4 machos y 0,4 juveniles) por maceta de 1,8 litros a los 34 DDS, lo cual aseguró al menos un ciclo completo del nematodo y alta presión por infectar y colonizar las raíces (cuadro 33).

Cuadro 33. Composición de la población de nematodos inoculados por maceta a los 34 DDS.

LECTURA	Hembras	Machos	Juveniles	Nematodos totales
1	461	45	0	506
2	476	49	2	527
3	448	52	0	500
4	467	29	0	496
5	461	42	0	503
PROMEDIO	462,6	43,4	0,4	506,4

Como se indicó en el punto 3.5.5.3., para evaluar el comportamiento de la población de nematodos derivada de los residentes en el suelo de siembra y poder comparar las densidades poblacionales en aquellos que sí recibieron inoculación artificial, se muestrearon grupos de 10 plantas sin inoculación de bacterias ni de nematodos.

Las figuras 36 y 37 muestran en una línea de color verde, el crecimiento del número de nematodos totales y *R. similis* en 100g de raíz, respectivamente, presentes en plantas no inoculadas artificialmente, para el período comprendido entre la siembra de las plantas (0 DDS) y la cosecha (77 DDS). La barra azul indica la densidad final del testigo inoculado con nematodos, pero sin aplicación de bacterias (TESTNEMA), mientras que la barra roja, muestra la densidad en el testigo con aplicación de Vydate® (TESTQUIM) el cual fue el único que evidenció una reducción significativa tanto para nematodos totales, como en *R. similis*, respecto a TESTNEMA.

Dado que la población de nematodos totales y de *R. similis* en el testigo absoluto (que no recibió aplicación artificial de este nematodo) al final del experimento fue ligeramente inferiores a la de TESTNEMA, se puede deducir que haber aplicado en promedio 506 nematodos a los 34 DDS, solo aseguró parcialmente una mayor infección y reproducción en la raíz disponible. Esto

posiblemente sucedió por efecto de competencia intraespecífica con los nematodos ya establecidos en las raíces.

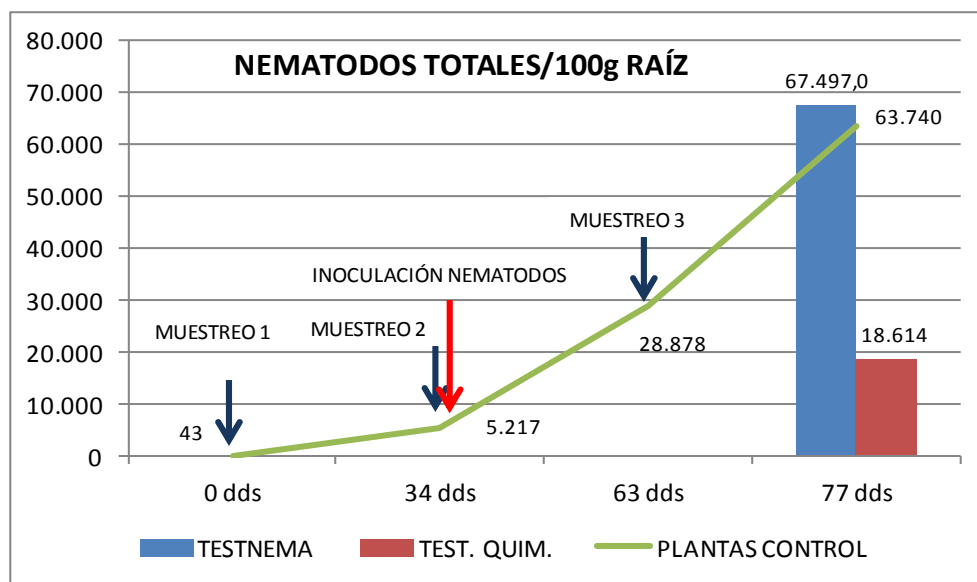


Figura 36. Reproducción de nematodos totales en plantas sin la aplicación artificial de *Radopholus similis*, en comparación con la densidad final presente en el testigo inoculado (TESTNEMA) y en el testigo químico.

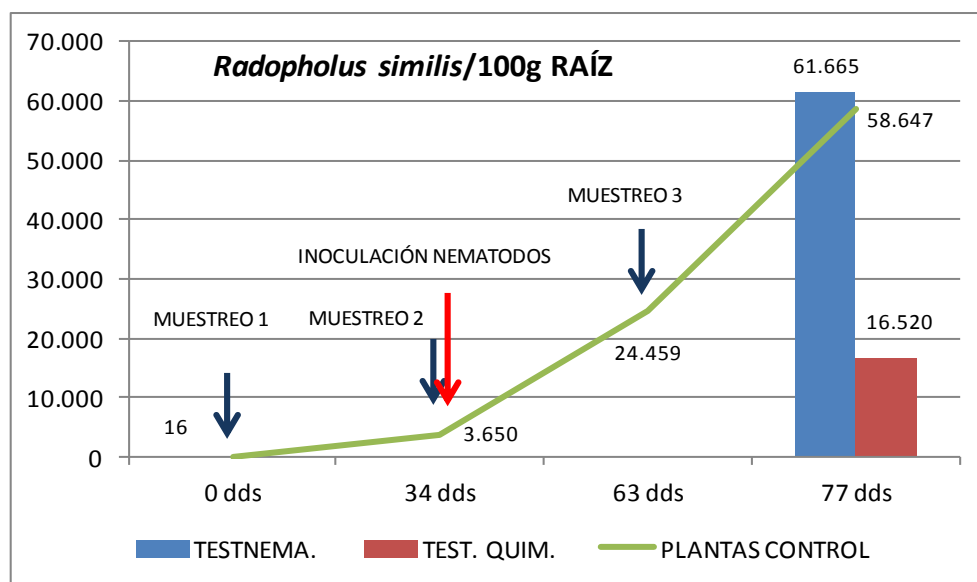


Figura 37. Reproducción de *Radopholus similis* en plantas sin su aplicación artificial, en comparación con la densidad final presente en el testigo inoculado (TESTNEMA) y en el testigo químico.

Se puede concluir que si bien no se observaron diferencias estadísticas en la densidad de los nematodos en comparación con TESTNEMA, el mejor crecimiento radical observado, así como los aportes al crecimiento vegetativo observados en general por algunos de los aislamientos aplicados, son un mecanismo de defensa de las plantas, puesto que estas tienden a tolerar a los nematodos y a minimizar sus efectos negativos.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones.

- El protocolo utilizado para la obtención de bacterias relacionadas al género *Bacillus*, fue efectivo pues permitió en un 80,9%, seleccionar bacterias esporulantes. Este porcentaje fue corroborado posteriormente al identificar mediante técnicas moleculares, que 16 de los 20 (80,0%) aislamientos seleccionados al azar para evaluarse a nivel de vivero, correspondieron a *Bacillus* sp, de acuerdo a la base de datos RDP.
- El sistema utilizado para caracterizar morfológicamente a los aislamientos fue útil para seleccionar candidatos fenotípicamente diversos y por tanto, para explorar con mayor amplitud, la gama de microorganismos extraídos de un suelo supresivo a *Radopholus similis*, que estuvieran relacionados al género *Bacillus*.
- Esta diversidad fue ratificada mediante la comparación de las secuencias obtenidas de los 20 candidatos seleccionados, con las secuencias depositadas en base de datos NCBI. En ese sentido se logró identificar a 10 aislamientos de *B. thuringiensis* (10), 4 de *B. pumilus*, y un aislamiento de cada una de las siguientes especies: *B. subtilis*, *B. mycooides* y *B. cereus*. Es importante también recalcar que todas estas especies han sido reportadas tanto como agentes promotores de crecimiento vegetativo, como reguladoras de la población de nematodos en general.
- Únicamente los aislamientos SER-217, SER-23 (no identificados) y SR-05 (*Bacillus mycooides*), lograron incrementar de forma significativa ($p=0,0025$), el peso fresco de la raíz, respecto al testigo con el cual se comparó (TESTNEMA). Porcentualmente estos incrementos fueron del 90,7%, 55,3% y 52,7%, respectivamente. No obstante, otros aislamientos como SR-23, SER-217 (no identificados) y R-13 (*B. thuringiensis*), aportaron también niveles de promoción de crecimiento interesantes, aunque sin diferir estadísticamente del testigo.

- La aplicación del nematicida Vydate® 24SL resultó en reducciones significativas en la densidad de nematodos totales ($P=0,0180$) y *R. similis* ($P=0,0111$), respecto a TESTNEMA, ratificando su elevada eficacia en el combate de nematodos. Por el contrario, ningún tratamiento con bacterias difirió estadísticamente de TESTNEMA, por lo que se puede concluir que ninguna de ellas tuvo efecto sobre la población de nematodos en la raíz.
- El análisis de las variables de crecimiento y de densidad de nematodos de forma agrupada según origen de los aislamientos: SER ($n=11$), SR ($n=5$) y R ($n=3$), no evidenció diferencias estadísticas respecto a TESTNEMA, por lo que se puede concluir para la cantidad de aislamientos incluida en cada grupo, que su origen no induce efectos en las variables señaladas.
- Son varios los factores que pudieron haber incidido en el desempeño de los aislamientos, entre estos, diferencias en las características de los suelos, características intrínsecas de las bacterias, la variedad de banano utilizada, el uso de suelo no estéril, la dosis y frecuencia de aplicación utilizadas y las características del cultivo bacteriano aplicado a las plantas. Este último factor pudo haber tenido mayor trascendencia pues de acuerdo a la literatura consultada, *Bacillus* spp produce las diferentes sustancias extracelulares (toxinas, enzimas líticas, sustancias volátiles y metabolitos secundarios) que tienen efecto sobre los nematodos, durante su fase estacionaria de cultivo. Contrariamente, en el experimento se utilizaron cultivos frescos en fase de crecimiento exponencial, con el objeto de favorecer una colonización más eficiente de la rizósfera y la endorriza.

5.2 Recomendaciones.

- Con base en la gran diversidad de nichos ecológicos y la enorme biodiversidad de microorganismos presentes en el suelo, se recomienda mantener y fortalecer los programas de prospección, caracterización y selección de candidatos de forma regionalizada, buscando desarrollar agentes con potencial de adaptarse a las condiciones de manejo convencional de las fincas bananeras. Se ha mencionado que por cada 100 candidatos evaluados, es muy probable que solo uno tenga el potencial y las características para generar un producto a escala comercial.
- Dado que la evaluación de candidatos a nivel de vivero resulta onerosa, lenta y sujeta al efecto de múltiples factores bióticos y abióticos, es necesario en primera instancia desarrollar investigación básica a nivel de laboratorio que permita dilucidar aspectos como: la estabilidad de los aislamientos en conservación, el estado fisiológico y la composición del cultivo, el mecanismo de acción de los candidatos (parasitismo, toxicidad, lisis, etc.), el rendimiento en escalamiento, e incluso, el efecto de consorcios de microorganismos, su compatibilidad y estabilidad en el tiempo. Esta información será clave para evitar al máximo que el potencial de los candidatos disminuya drásticamente en niveles más avanzados del desarrollo tecnológico.
- En una fase intermedia de estudio a nivel de vivero, a efecto de asegurar una buena fijación, colonización y buscar obtener la mayor actividad reguladora posible de las bacterias, es necesario revisar el impacto de aspectos como el tipo y características químicas, físicas y texturales del suelo; las diferencias de colonización entre cultivares; estado fenológico de las plantas; el tipo de mantenimiento que se les proporciona; el tiempo destinado para poder observar los efectos, y la dosis y frecuencias de aplicación, entre otras cosas.

- La herramienta más adecuada para determinar si ha habido una buena colonización radical por parte de los microorganismos inoculados, es la biología molecular mediante PCR en tiempo real, cuantificando los picogramos de ADN presentes en la rizósfera o la endorriza. La biología molecular permitiría también estudiar el efecto de los factores bióticos y abióticos, incluyendo el manejo dado al cultivo, que están relacionados a la dinámica y composición de microorganismos en un suelo supresivo. Quizá con esta información se puedan diseñar programas de atención que induzcan a mayores índices de supresividad, sin la necesidad de realizar inoculaciones a vitroplantas (mejoramiento biológico), ni aplicaciones de tipo inundativo.
- Se recomienda valorar la eficacia de técnicas otras técnicas diferentes a la esterilización a 1201°C, para eliminar a los nematodos residentes, pues se ha demostrado que esta afecta significativamente la microflora original y los contenidos de materia orgánica y elementos químicos. Se debe de considerar la evaluación de la pasteurización o el sometimiento del suelo a temperaturas y tiempos de exposición menores a esta. Es de suma importancia que las unidades experimentales contengan similares poblaciones de nematodos.
- En estudios más avanzados, el enfoque de los experimentos, así como el análisis de los resultados, debe de ser integral, incluyendo no solo el efecto de control de un agente patológico específico y el crecimiento de las plantas, sino también otros posibles beneficios que el agente puede estar aportando, como por ejemplo, la inhibición a fitopatógenos como *Mycosphaerella fijiensis* (agente causal de la Sigatoka negra), *Ralstonia solanacearum* (agente causal del moko), *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*; la inducción de resistencia sistémica y el efecto antiestrés, entre otros.

6. REFERENCIAS

Altschul, SF., Madden, TL., Schäffer, AA., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25:3389-3402. Disponible en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

AOAC 2000. Official Method 994.16 pH Measurement of Mineral Soils..

Araya, M. 2003. Situación actual de manejo de nematodos en banana (*Musa* AAA) y plátano (*Musa* AAB) en el trópico americano. 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. 79-102.

Araya, M. 2004. Los fitonematodos del banano (*Musa* AAA subgrupo Cavendish cultivares Grande Naine, Valery y Williams) su parasitismo y combate. In XVI Reunión Internacional ACORBAT. Oaxaca, México. 84-105 p.

Araya-Vargas, M.; Cheves-Vargas, A. 1998. Selection for plant type for banana (*Musa* AAA) nematode sampling. *Infomusa* 7(1):23-26.

Araya, M.; de Waele, D. 2004. Spatial distribution of nematodes in three banana (*Musa* AAA) root parts considering two root thickness in three farm management systems. *Acta OEcologica* 26(2):137-148.

Araya, M.; Moens, T. 2003. Parasitic nematodes on *Musa* AAA (Cavendish subgroup cvs. "Grande Naine", "Valery" and "Williams"). In Turner DW.; Rosales FE., eds. Banana root system: towards to a better understanding for its productive management. INIBAP. San José, Costa Rica. p. 201-223.

Araya, M.; Vargas, A. 1997. Determinación del tipo de planta adecuada para el monitoreo de fitonematodos en plátano (*Musa AAA*). *Uniciencia* 14(1):5-10.

Arrieta, G. y Espinoza, AM. 2005. Characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain collection isolated from diverse Costa Rica natural ecosystems. *International Journal of Tropical Biology* 54(1):13-27.

Athman, SY.; Dubois, T.; Coyne, D.; Gold, CS.; Labuschagne, N.; Viljoen, A. 2007. Effect of endophytic *Fusarium oxysporum* on root penetration and reproduction of *Radopholus similis* in tissue culture-derived banana (*Musa* spp.) plants. *Nematology* 9(5): 599-607.

Avis, TJ., Gravel, V., Antoun, H., Tweddell, RJ. 2008. Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. *Soil Biology & Biochemistry* 40: 1733-1740 p.

Ayuso, F. 2002. Efecto de enmiendas orgánicas y de un hongo micorrízico sobre *Radopholus similis* en banano (*Musa AAA* cv Valery). *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)* 65:82-91.

Badía, M.; Hernández, B., Murrel, J.; Mahillon; Pérez, M. 2011. Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus* asociadas al cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Revista Brasileña de Agroecología* 6(11): 90-99.

Bargabus, RL., Zidack, NK., Sherwood, JW., Jacobsen, B.J. 2002. Characterization of systemic resistance in sugar beet elicited by a non-pathogenic, phyllosphere-colonizing *Bacillus mycoides*, biological control agent. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 61(5):289-298.

Barker, KR., Koenning, SR. 1998. Developing sustainable systems for nematode management. *Annual Review of Phytopathology* 36:165-205.

Brandfass, C; Karlovsky P. 2008. Upscaled CTAB-Based DNA Extraction and Real-Time PCR Assays for *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* DNA in Plant Material with Reduced Sampling Error. *Journal of Molecular Science* 9:2306-2321.

Brooks, F. 2004. Banana Nematodes. Pest and Diseases of American Samoa. American Samoa Community College. Community & Natural Resources. Cooperative Research & Extension. Number 9.

Brooks, FE. 2008. Burrowing nematode. The Plant Health Instructor. APSNet. Consultado 15 marzo 2014. Disponible en <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/Nematodes/Pages/Burrowingnematode.aspx>

Buttler, D. 2013. Fungus threatens top banana (en línea). NATURE. International weekly Journal of Science. Consultado 8 abril. Disponible en <http://www.nature.com/news/fungus-threatens-top-banana-1.14336>

Cabrera, JA.; Pocasangre, LE.; Pattison, AB.; Sikora, RA. 2010. Terbufos biodegradability and efficacy against *Radopholus similis* in soils from banana cultivation having different histories of nematicide use, and the effect of terbufos on plant growth of in vitro-propagated Musa AAA cv. Grande Naine. *International Journal of Pest Management* 56(1):61-67.

Cañizares, CA. 2003. Estudio sobre poblaciones de hongos endofíticos provenientes de suelos supresivos al nematodo barrenador *Radopholus similis*

(Cobb) Thorne en plantaciones comerciales de plátano en la zona de Talamanca, Costa Rica. Tesis M. Sc. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 75 p.

Carreras-Solís, B. 2009. Obtención de aislados de *Bacillus thuringiensis* autóctonos de Cuba. Fitosanidad 13(2): 109-115.

Chabrier, C.; Tixier, P.; Duyck, PF. 2010. Survival of the burrowing nematode *Radopholus similis* (Cobb) Thorne without food: Why do males survive so long? Applied Soil Ecology 45: 85-91.

Cavarría-Carvajal, JA.; Vicente, N.; Ortíz, J. 2006. Effect of organic amendments on nematode populations and crop yield of plantain. Nematropica 36(2):118.

Chávez-Velazco, C.; Solórzano-Figueroa, F.; Araya-Vargas, M. 2009. Relación entre nematodos y la productividad del banano (*Musa AAA*) en Ecuador. Agronomía Mesoamericana 20(2):351-360.

Chen, J.; Abawi, GS.; Zuckerman, BM. 2000. Efficacy of *Bacillus thuringiensis*, *Paecilomyces marquiandii*, and *Streptomyces costarricanus* with and without Organic Amendments against *Meloidogyne hapla* Infecting Lettuce. Journal of Nematology 32(1):70-77.

Chitwood DJ. Research on plant-parasitic nematode conducted by the United States Depart of Agriculture-Agricultural Research service. Pest Managemnt Science 59: 748-753.

Cook, R.J.; Baker, KF. 1983. The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. American Phytopathological Society. St. Paul. 539 p.

CORBANA (Corporación Bananera Nacional). 2011. Manual de Buenas Prácticas Agrícolas en el Cultivo de banano. Ed. E. Bolaños. 176p. 1 Ed.

CORBANA (Corporación Bananera Nacional), CR. 2014. Estadísticas de Producción Bananera. San José, CR. Consultado 10 abril. 2014. Disponible en <http://www.corbana.co.cr>.

Coyne, D.; Dubois, T.; Athman, S.; Papparu, P. 2006. Endophyte-enhanced tissue culture banana in East Africa: towards biological management of the burrowing nematode. *Nematropica* 36(2): 118-119.

Cubillo, 2013. Manejo integrado de insectos plagas en el cultivo de banana. 1^{era} ed. Grupo Diseños Impresos. San José, Costa Rica. 116 p.

DRAE (Diccionario de la Real Academia Española), ESP. 2014. Diccionario de la Lengua Española. 22 ed. Publicada en 2001. España. Consultado 22 abril 2014. Disponible en <http://lema.rae.es/drae/>.

Duponnois, R.; Ba, AM.; Mateille, T. 1998. Effects of rhizosphere bacteria for the biocontrol of nematodes of the genus *Meloidogyne* with *Arthrobotrys oligospora*. *Fundamental of Applied Nematology* 21(2):157-163.

DuPont. 2003. DuPont TM Vydate® insecticide/nematicide. Protect your crops against damage from insects, mites and nematodes. Consultado 2 mayo 2014. Disponible en:

http://www2.dupont.com/Production_Agriculture/en_US/assets/downloads/pdfs/H-95402.pdf

Elsen, A.; Gervacio, D., Swennen, R. De Waele, 2008. D. AMF-induced biocontrol against plant parasitic nematodes in *Musa sp.*: a systemic effect. *Mycorrhiza* 18: 251-256.

Esnard, J.; Marban-Mendoza. N.; Zuckerman, BM. 1998. Effects of three microbial broth cultures and an organic amendment on growth and populations of free living and plant-parasitic nematodes on banana. *European Journal of Plant Pathology*. 104: 457-463.

Esquivel Hernández, A., Peraza Padilla, W. 2010. Nematodos fitoparásitos asociados a cultivos agrícolas de Costa Rica. Universidad Nacional. Facultad de Ciencias de la Tierra y el Mar. Escuela de Ciencias Agrarias. Laboratorio de Nematología. Heredia, Costa Rica. 104p. Disponible en: <http://www.agrarias.una.ac.cr/index.php/descargas-electronicas/category/29-diagnostico-fitosanitario%3Fdownload%3D40:manual-de-cultivos+%&cd=4&hl=es-419&ct=clnk&gl=crn>

Etebu, E.; Young-Harry, W. 2011. Control of black Sigatoka disease: Challenges and prospects. *African Journal of Agricultural Research* 6(3):508-514.

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.

Fernández-Larrea, O.; Cejas, A.; Márquez, ME. 2009. Influencia del medio de cultivo, el tipo de inóculo y las condiciones de agitación-aereación en la reproducción de dos cepas de *Bacillus thuringiensis* (Berl.) en fermentadores de diferentes volúmenes. *Fitosanidad* 13(3): 201-209p.

Figueroa, A.; Molina, ME.; Pérez, L. Cultivos alternos para controlar nematodos en renovación de plantaciones bananeras. *Asbana* 14(33):19-26.

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

Garnacho-Montero, J.; Ortíz-Leyba, C.; Fernández-Hinojosa, E. 2004. Tratamiento antibiótico de las infecciones graves por *Acinetobacter* spp. *Revista Electrónica de Medicina Intensiva*. 4(6): 1-9. Disponible en: <http://remi.uninet.edu/2004/06/REMIC04.htm#autores>

Gómez, MJ.; Rojas, T. 2008. Efecto de dos especies de hongos simbiotes en el crecimiento de plátano (*Musa AAB*) cv "Curraré" y el control del nematodo barrenador *Radopholus similis* COBB. *Revista Tumbaga* 3: 30-42.

Thomas, GW. 1982. *Methods of Soil Analysis*. Second Edition, Madison Wisconsin. USA. 161-164 p.

Guillén, C.; Rodríguez, A.; Laprade, S. Valle, H.; Segura, R.; Uva, V.; Sandoval J. 2010. *Biología y Control de las cochinillas y escamas que atacan al banano*. Hoja Divulgativa N°5. Proyecto REPCar. 2p. Disponible en <http://cep.unep.org/repcar/proyectos-demostrativos/costa-rica-1/costa-rica>

Guzmán, OA. 2011. El nematodo barrenador (*Radopholus similis*) Cobb Thorne del banano y el plátano. *Luna Azul* 33: 137-153.

Hallmann, J.; Sikora, RA. 1996. Toxicity of fungal endophyte secondary metabolites to plant-parasitic nematodes and soil-borne plant pathogenic fungi. *European Journal of Plant Pathology* 102:155-162.

Honfo, F.G.; Tenkouano, A.; Coulibaly, O. 2011. Banana and plantain-based foods consumption by children and mothers in Cameroon and Southern Nigeria: A comparative study. *African Journal of Food Science* 5(5): 287-291.

Hope, S. 1989. *Bacillus thuringiensis*: Industry Frenzy and Host Issues. Journal of Pesticide Reform 9(1):18-21.

Huang, XW.; Niu, QH.; Zhou, W.; Zhang, KQ. 2005. *Bacillus nematocida* sp. Nov., a novel bacterial strain with nematotoxic activity isolated from soil in Yunnan, China. Systematic and Applied Microbiology 28: 323-327.

IICA (Instituto Interamericano de Cooperación Agrícola, RD). 2007. Estudio de la cadena agroalimentaria de banano en la República Dominicana. Secretaría de estado de Agricultura. Concejo Nacional de Competitividad. Santo Domingo, República Dominicana.

IOBC Internet Book of Biological Control. 2012. Versión 6. Ed. Van Lenteren. J. Disponible en: http://www.iobc-global.org/publications_iobc_internet_book_of_biological_control.html

Jackson, GVH.; Ruabete, TK.; Wrigth, JG. 2003. Burrowing and lesions Nematodes of Banana. Plant Protection Service. Secretariat of the Pacific Community. Pest Advisory Leaflet N° 5. 2 ed. 4 p.

Jaizme-Vega, MC.; Rodríguez-Romero, AS. 2004. Uso de micorrizas en banana: logros y perspectivas. In XVI Reunión Internacional ACORBAT. Oaxaca, México. 143-159.

Jonathan, EI.; Umamaheswari, R. 2006. Biomangement of nematodes infesting banana by bacterial endophytes (*Bacillus subtilis*). Indian Journal of Nematology 36(2): 213-216.

Khan, A.; Williams KL.; Nevalainen HKN. Control of plant-parasitic nematodes by *Paecilomyces lilacinus* and *Monacrosporium lysipagum* on pot trials. Biocontrol 51:643-658.

Kim, HS.; Park, J.; Choi SW.; Choi, KH.; Lee, GP.; Ban SJ.; Lee, CH.; Kim, CS. 2003. Isolation and Characterization of *Bacillus* Strains for Biological Control. *The Journal of Microbiology* 41(3):196-201.

Köhl, J., Postma, J., Nicot, P., Ruocco, M., Blum, B. 2011. Stepwise screening of microorganisms for commercial use in biological control of plant-pathogenic fungi and bacteria. *Biological Control* 57:1–12.

Kremer, RJ. 2006. Deleterious rhizobacteria. In Ed. Gnanamanickam. *Plant Associated Bacteria Netherlands*. 335-357 p.

Kuske, C R.; Banton, K L.; Adorada, DK.; Stark, PC.; Hill, KK.; Jackson PJ. 1998. Small-Scale DNA Sample Preparation Method for Field PCR Detection of Microbial Cells and spores in Soil. *Applied Environmental Microbiology* 64(7):2463-2472.

Hershey, RD. 1994. Solution Culture Hydroponics: History & Inexpensive Equipment. *The American Biology Teacher* 56(2): 111-118.

Leyns, F.; Borgonie G.; Arnaut, G.; De Waele, D. Nematicidal activity of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Fundamentals of Applied Nematology* 18(3):211-218.

Lodewyckx, C.; Vangrosveld, J.; Porteus, F.; Moore, ERB.; Taghavi, S.; Mezgeay, M.; van der Leile, D. 2002. Endophytic bacteria and their potential applications. *Critical Reviews in Plant Science* 21(6): 583-606.

López, LV.; Margaref, R. 2010. Ecología de los hongos nematófagos en el suelo y rizósfera: modo de acción y aplicaciones prácticas. *Fitosanidad*14(1):56.

Niedmann, L.; Meza-Basso, L. 2006. Evaluación de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* como una alternativa de manejo integrado del la polilla del tomate (*Tuta absoluta* Meyrick; Lepidoptera: Gelechiidae) en Chile. *Agricultura Técnica* 66(3): 235-246.

Noel, GR. Evaluation of Thurengesin for Control of *Heterodera glycines* on Soybean. Supplement of *Journal Nematology* 22(45):763-766.

Mc Sorley, R. Parrado, JL. 1986. *Helicotylenchus multicinctus* on bananas: An international problem. *Nematropica* 16(1): 73-91.

Marín, DH.; Sutton TB.; Baker, KR. Dissemination of Bananas in Latin America and the Caribbean and its relationship to the Occurrence of *Radopholus similis*. *The American Phytopathology Society* 82(9): 964-974.

Marín, HD.; Romero, RA.; Guzmán, M.; Sutton, TB. 2003. Black Sigatoka: An Increasing Thread to Banana Cultivation. *Plant Disease* 87(3): 208-222.

Márquez, ME.; Fernández, E. 2006. Selección de cepas de *Bacillus thuringiensis* con efecto nematicida. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología* 78: 63-69.

Marroquin, LD.; Elyassnia, D.; Griffitts, JS.; Feitelson, JS.; Aroian, R. *Bacillus thuringiensis* (Bt) Toxin Susceptibility and Isolation Resistance Mutants in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 155:1693-1699.

Martinuz, A., Navarro, G., Pocasangre, L., Quirós, L. 2011. Assessment of Non-chemical Alternatives for Controlling de Burrowing Nematode on Banana in Costa Rica. *Journal of Agricultural Science and Technology* 1:550-562.

- Mehlich. 1984. Mehlich 3 Soil Test Extract: A modification of Mehlich 2 extractant. *Soil and Plant Anal.* 15(12): 1409 – 1416.
- Mendoza, A.; Sikora, RA.; Kiewnick, S.; 2006. Biological control of *Radopholus similis* in banana with the antagonistic fungi *Paecilomyces lilacinus* strain 251 (PL251) and *Fusarium oxysporum* strain 162 (FO162). *Nematropica* 36(2):135.
- Mendoza, AR. Kiewnick, S.; Sikora, RA. 2008. In vitro activity of *Bacillus firmus* against the burrowing nematode *Radopholus similis*, the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and the stem *Ditylenchus dipsaci*. *Biocontrol Science and Technology.* 18(4): 377-389.
- Mendoza, AR.; Sikora, RA. 2008. Sequential Application of Antagonists for Biological Control of the Burrowing Nematode *Radopholus similis* in Banana. In *Competition for resources in a Changing World: New Drive for Rural Development.* Hohenheim, Germany. p. 209.
- Murray, DS. 1980. Uso de nematicidas en escala comercial en plantaciones bananeras del Atlántico. *ASBANA.* 4(13):8-16.
- Nelson, D.W; Sommers, L.E. 1982. Total Carbon, Organic Carbon and Organic Matter. In *Methods of Soil Analysis. Part 2, Madison Wisconsin USA.* 539-580 p.
- Niedman-Lolas, L.; Meza-Basso, L. 2006. Evaluación de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* como una alternativa de manejo integrado de la polilla del tomate (*Tuta absoluta* Meyrick; Lepidoptera: Gelechiidae) en Chile. *Agricultura Técnica* 66(3):235-246.

Niere, B.; Coyne, D.; Gold, CS.; Shahasi, A.; Dubois, T. 2004. Potential of fungal endophytes in nematode management. In 1st International Congress on Musa. Abstract Guide. Peneng, Malaysia. p. 134.

Noling, JW.; Becker, JO. 1994. The Challenge of Research and Extention to Define and Implement Alternatives to Methyl Bromide. *Journal of Nematology* 26(45):573-586.

Orozco, M.; Álvarez, V.; Jiménez, A.; Acuña, O. Isolation, identification and morphological and physiological characterization of nematofagous fungi from five countries of Costa Rica. *Nematropica* 36(2):138.

Padgham, JL. Y Sikora, RA. 2007. Biological control potential and modes of action of *Bacillus megaterium* against *Meloidogyne graminicola* on rice. *Crop Protection* 26: 971-977.

Paparu, P.; Dubois, T.; Gold, CS.; Niere, B.; Adipala, E., Coyne, DL. 2006. Improved colonization of East African Highland *Musa* tissue Culture Plants by *Fusaroun oxysporum*. *Journal of Crop Improvement* 10(1/2) (#31/32): 81-95.

Paparu, P.; Dubois, T.; Coyne, D.; Viljoen, A. 2007. Defense-related gene expression in susceptible and tolerant bananas (*Musa* spp.) following inoculation with non-pathogenic *Fusarium oxysporum* endophytes and challenge with *Radopholus similis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 71: 149-157.

Paparu., P.; Dubois, T.; Coyne, D.; Viljoen, A. 2009. Dual inoculation of *Fusarium oxysporum* endophytes in banana: effect on plant colonization, growth and control of the root burrowing nematode and banana weevil. *Biocontrol Science and Technology* 19(6): 639-655.

Pattison, AB. The importance of the antagonistic potential in the management of populations of plant-parasitic nematodes in banana (*Musa AAA*) as influenced by agronomic factors. Tesis Ph. D. Universidad de Bonn, Germany. 154p.

Pattison, AB.; Badcock, K.; Sikora, RA. 2011. Influence of soil organic amendments on suppression of the burrowing nematode, *Radopholus similis*, on the growth of bananas. *Australasian Plant Pathology* 40:385-396.

Peraza, W.; Esquivel, A.; Chaverri, F.; Rivera, G.; Ramirez, F.; Guzmán, T. Bioprospection of soil nematofagous fungi on agricultural soils of Costa Rica, as potential alternative for chemical soil disinfestations. Poster. In *Memorias IV Congreso ONTA 2009*. Maceió, Brasil. Disponible en <http://abis.upc.es/ONTA/node/172>

Pinochet, J. A note of nematode control practices on bananas in Central America. *Nematropica* N°2: 197-203.

Ploetz, R. 2004. Diseases and Pests: A review of their importance and management. *Infomusa* 3(2): 11-16.

Pocasangre, L.; Sikora, RA.; Vilich, V.; Schuster, RP. 2000. Encuesta sobre hongos endofíticos del banana de América Central y el cribado para el control biológico del nematodo barrenador (*Radopholus similis*). *Infomusa* 9(1):3-5.

Pocasangre, LE.; zum Felde, A.; Meneses, A.; Cañizares, C.; Riveros, AS.; Rosales, FE.; Sikora, R. 2004. Manejo Alternativo de fitonematodos en banano y plátano. In *XVI Reunión Internacional ACORBAT*. Oaxaca, México. 106-112p.

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 Reunión Internacional da Associação para a Coperação nas Pequisas sobre Banana no Caribe e na América Tropical. ACORBAT. Joinville, Santa Catarina, Brasil. p.249-254.

PROCOMER (Promotora del Comercio Exterior de Costa Rica). 2013. Estadísticas de Comercio Exterior de Costa Rica 2012. Calderón JC. ed. Primera edición. San José, Costa Rica. 245 p.

QiuHong, N.; Xiaowei, H.; Baoyu, T.; Jinkui, Y.; Jiang, L.; Keqin, Z.; 2006. *Bacillus* sp. B16 kills nematodes with a serine protease identified as a pathogenic factor. Applied Microbiology and Biotechnology 69(6):722-730.

Quénéhervé, P.; Kadet, P.; Mateille, t. 1991. New approaches to chemical control of nematodes on bananas: field experiments in the Ivory Coast. Review of Nematology 14(4):453-549.

Quirós, O.; Salas, E.; Vargas, R.; Araya, M. 2012. Estructura de la comunidad microbiana de un suelo supresivo y conducivo a *Radopholus similis* mediante PCR cuantitativo para taxones específicos. Poster. In Memorias IV Congreso Internacional sobre Banano. Heredia, Costa Rica.

Rao-Podile, A. y Krishna-Krishore, G. 2006. Plant Growth Promoting Rhizobacteria. In Ed. Gnanamanickam. Plant Associated Bacteria Netherlands. 195-230 p.

Reyes-Matamoros, J. 2002. Diccionario de Biología (en línea). Puebla, México. Consultado 22 abril 2014. Disponible en http://148.228.97.152/jenaroreyes/libros/Libro_4.pdf.

Risede, JM.; Chabrier, C.; Dorel, M.; Dambas, T.; Archard, R.; Queneherve, P. 2010. Integrated management of banana nematodes: Lessons from a case study in the French West Indies. Sixth Framework Programme, priority 5: Food Quality and Security. ENDURE, France. Banana Case study, Guide N. 4. 8 p.

Rodas-Junco, BA.; Quero-Bautista M.; Magaña-Sevilla, HF.; Reyes-Ramírez, A. 2009. Selección de cepas nativas con actividad Quitino-proteolítica de *Bacillus* sp aisladas de suelos Tropicales. Revista Colombiana de Biotecnología XI(1):107-113.

Salehi Jouzani, G., Seifinejad, A.; Saeedizadeh, A.; Nazarian, A.; Yousefloo, M., Soheilvand, S.; Mousivand, M.; Jahangiri, R.; Yazdani, M.; Maali, R.; Akbari, S. 2008. Molecular detection of nematocidal crystalliferous *Bacillus thuringiensis* strains of Iran and evaluation of their toxicity on free living and plant-parasitic nematodes. Canadian Journal of Microbiology 54: 812-822.

Santos JRP.; Andrade EP.; Costa DC.; Gonzaga, V.; Cares, JE. 2012. Comparison of two methods for in vitro multiplication of *Radopholus similis* and *Pratylenchus brachyurus* in carrot cylinders. Tropical Plant Pathology 37(4): 266-270.

Sarah, JL.; Pinochet, J.; Stanton, J. 1996. El nematodos barrenador del banano *Radopholus similis* Cobb. Plagas de Musa. Hoja Divulgativa N°1, diciembre. Red Internacional para el mejoramiento del banano y el plátano. Montpellier, Francia. 2p.

Sarah, JL. 1989. Banana nematodes and their control in Africa. Nematropica 19(2):199-216.

Sarduy, Y. 2007. El análisis de la información y las investigaciones cuantitativa y cualitativa. *Revista Cubana de Salud Pública* 33(2): 1-11.

SAS Institute Inc. 2008. SAS/STAT® 9.2. The GenMod Procedure. Users Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc. Disponible en: <https://support.sas.com/documentation/cdl/en/statuggenmod/61787/PDF/default/statuggenmod.pdf>

Siddiqi, ZA.; Mahmood, I. 1999. Role of bacteria in the management of plant-parasitic nematodes: A review. *Biosource Technology* 69: 167-179.

Siddiqui, ZA.; Qureshi, A.; Akhtar, MS. 2009. Biocontrol of root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by *Pseudomonas* and *Bacillus* isolates on *Pisum sativum*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 42(12):1154-1164.

Sikora, RA.; Pocasangre, LE. 2004. Nuevas tecnologías para mejorar la salud de las raíces y aumentar la producción de los cultivos. *Infomusa* 3(2): 25-29.

Sikora, R.A.; Pocasangre, L. 2006. The concept of a suppressive banana plant: root health management with biological approach. In XVII Reunião de Associação para a Cooperacao nas Pesquisas sobre banana no Caribe e na América Tropical. Joinville, Santa Catarina Brasil. p. 241-248.

Sikora, RA.; Pocasangre, L., zum Felde, A., Niere, B.; Vu TT.; Dababat, AA. 2008. Mutualistic endophytic fungi and in-planta suppressiveness to plant-parasitic nematodes. *Biological Control* 46: 15-23.

Sikora, RA., zum Felde, A., Mendoza, A., Menjivar, R., Pocasangre, L. 2010. In Planta Suppressiveness to Nematodes and Long Term Root Health Stability through Biological Enhancement. Do We Need a Cocktail? *Acta Hort.* (ISHS) 879:553-560.

Sparks, D.L. 1996. Methods of Soil analysis, Part 3 Chemical Methods, Soil Science Society of America, Wisconsin, USA.

Speijer, P.R.; De Waele, D. 1997. Screening of *Musa* germplasm for resistance and tolerance to nematodes. INIBAP Technical Guidelines, N° 1. Screening of Musa Germplasm for Resistance and Tolerance to Nematodes. Montpellier, France. pp. 47.

Soto, M. 1991. Bananos, cultivo y comercialización. 3ed. Lit. Imprenta Lil, S.A. San José, Costa Rica, 648p.

Stover RH. 1980. Sigatoka leaf spots of bananas and plantains. Plant Disease 4(8): 75'-756.

Strigul, NS. Y Kravchenko, LV. 2006. Mathematical modeling of PGPR inoculation into the Rhizosphere. Environmental Modeling & Software 21: 1158-1171.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. [Molecular Biology and Evolution](#) 28: 2731-2739.

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.

Tarabant, P.; Villenave, C.; Riséde, JM.; Estrade, JR.; Dorel, M. 2011. Effects of organic amendments on plant-parasitic nematode population, root damage, and banana plant growth. *Biology and Fertility of Soils*. 47:341-347.

Terefe, M.; Tefera, T.; Sakhuja, PK. 2009. Effect of a formulation of *Bacillus firmus* on root-knot nematode *Meloidogyne incognita* infestation and the growth of tomato plants in the greenhouse and nursery. *Journal of invertebrate pathology* 100: 94-99.

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.

Timper, P. 2011. Utilization of Biological Control for Managing Plant-Parasitic Nematodes. In Eds. Davies, K., Spiegel, Y. *Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes: Building Coherence between Microbial Ecology and Molecular Mechanisms*, Progress in Biological Control 11. Chapter 11. p. 259-289.

Tripathi, L., 2003. Genetic Engineering for improvement of *Musa* production in Africa. *African Journal of biotechnology* 2(12): 503-508.

UNAM, MEX. 2014. Departamento de Parasitología y Microbiología. Glosario (en línea). México. Consultado 22 abr. 2014. Disponible en <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/glosario.html>).

Vargas, R.; Araya, M. 2007. Efecto de microorganismos para el control biológico de *Radopholus similis* en plantas in vitro de banano (*Musa AAA*) cultivadas en macetas. *Revista Científica de la Corporación Bananera Nacional* 33(60):59-61.

Vargas, R.; Solórzano, C.; Salas, E.; Quesada, M.; Quirós, O.; Araya, M. 2102. Evaluación de un suelo supresor a *Radopholus similis* en una plantación

comercial de banano (*Musa* AAA). Poster. In Memorias IV Congreso Internacional sobre Banano. Heredia, Costa Rica.

Vetrivelkai, P.; Sivakumar, M.; Jonathan, IE. 2010. Biocontrol potential of endophytic bacteria on *Meloidogyne incognita* and its effect on plant growth in behndi. *Journal of Biopesticides* 3(2):452-457.

Vilich, V.; Sikora, RA. 1998. Diversity in Soilborne Microbial Communities: A Tool for Biological System Management of Root Health. p 1-15. In Boland GJ.; Kuykendall, LD. eds. *Plant-Microbe Interactions and Biological Control*. Marcel Decker Inc. New York, USA.

Volcy, C. 2011. Past and present of nematode *Radopholus similis* (Cobb) Thorne with emphasis on *Musa*: a review. *Agronomía Colombiana* 29(3): 433-440.

Visca, P.; Petrucca, A.; De Mori, P.; Festa, A.; Boumis, E.; Antinori, A.; Petrosillo, N. 2001. Community-Acquired *Acinetobacter radioresistens* Bacteremia in an HIV-Positive Patient. *Emerging Infectious Diseases* 7(6): 1032-1035.

Wei.; BQ.; Xue., QY.; Wei.; LH.; Nui, DD.; Liu, HX.; Chen, LF.; Guo, JH. 2009. A novel screening strategy to identify biocontrol fungi using protease production or chitinase activity against *Meloidogyne* root-knot nematodes. *Biocontrol Science and Technology* 19(8):859-870.

Westphal, A. 2005. Detection and Description of Soils with Specific Nematode Suppressiveness. *Journal of Nematology* 37(1):121-130.

zum Felde, A. 2002. Screening of Endophytic Fungi from Banana (*Musa*) for Antagonistic Effects towards the Burrowing Nematode, *Radopholus similis* (Cobb) Thorne. M Sc. Thesis. University of Bonn, Germany.

zum Felde, A.; Pocasangre, L.; Sikora, RA. 2005. The potential use of microbial communities inside suppressive banana plants for banana root protection. In Turner DW.; Rosales, FE. eds. *Banana Root System: towards a better understanding for its productive management*. San José, Costa Rica. 261 p.

zum Felde, A.; Pocasangre, LE.; Cañizares, CA.; Sikora, RA.; Rosales, FE.; Riveros, AS. 2006. Efecto de inoculaciones combinadas de hongos endofíticos en el biocontrol de *Radopholus similis*. *Infomusa* 15(2): 12-18.

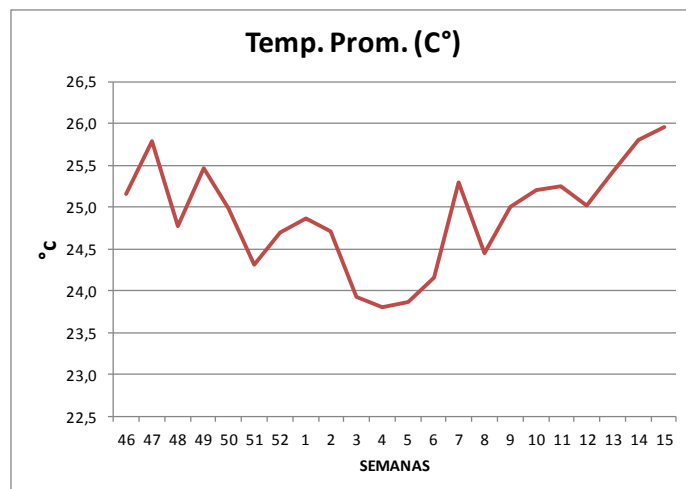
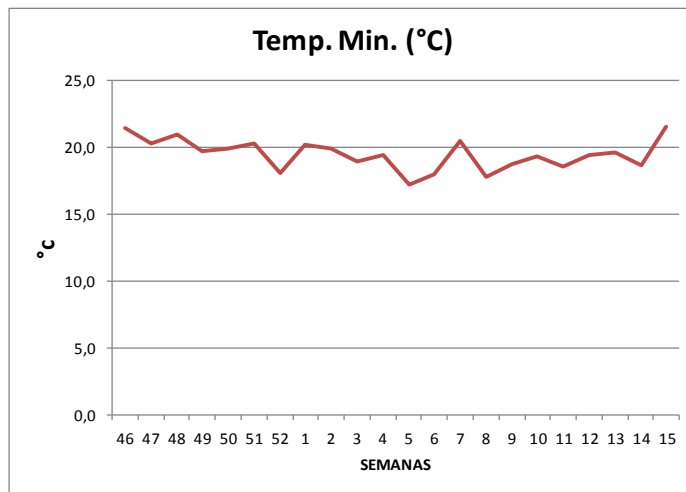
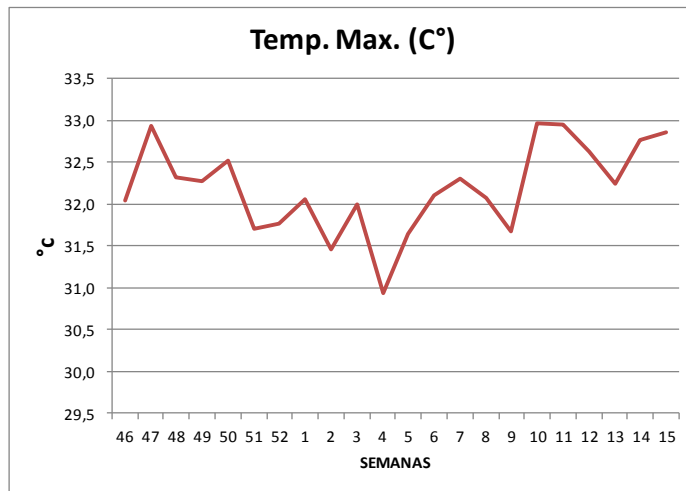
zum Felde, A. Mendoza, A.; Cabrera, JA.; Kurtz, A.; Schouten, A.; Pocasangre, L.; Sikora, RA. 2009. The Burrowing Nematode of Banana: Strategies for Controlling the Uncontrollable. In Jones, D.; van den Bergh, I. eds. *Proceedings IS on Banana Crop Protection, Sustainable Production & Impr. Livelihoods*. p. 101-108.

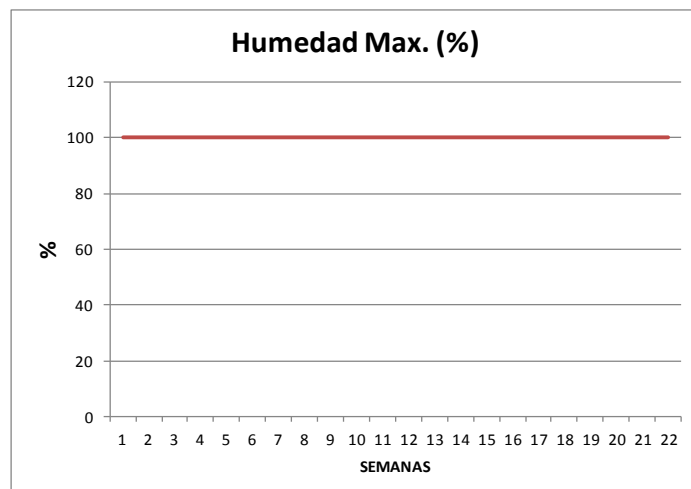
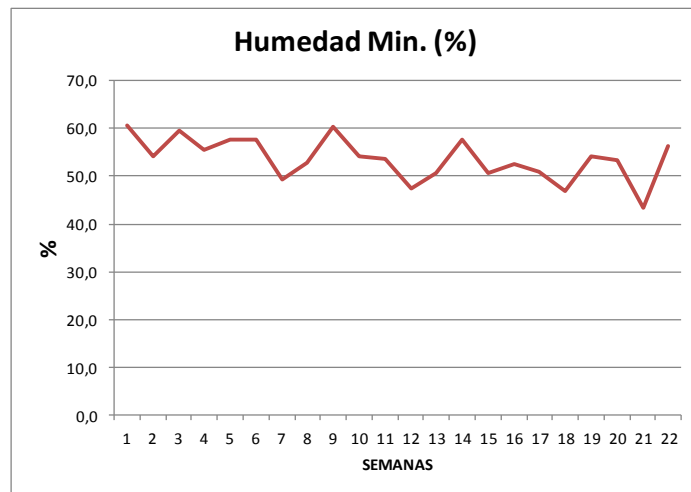
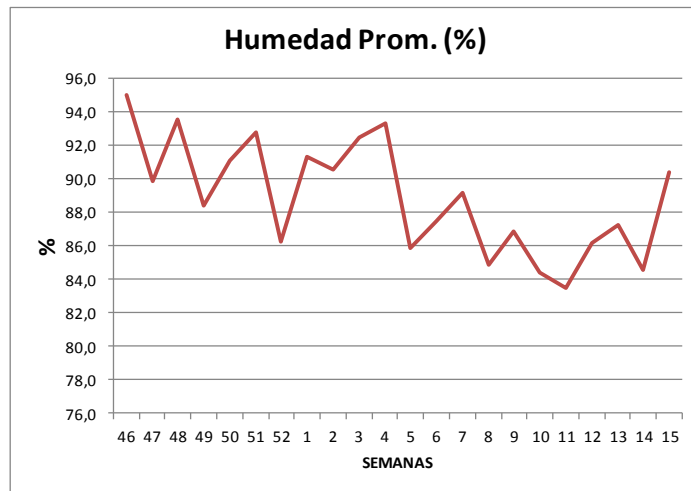
7. ANEXOS

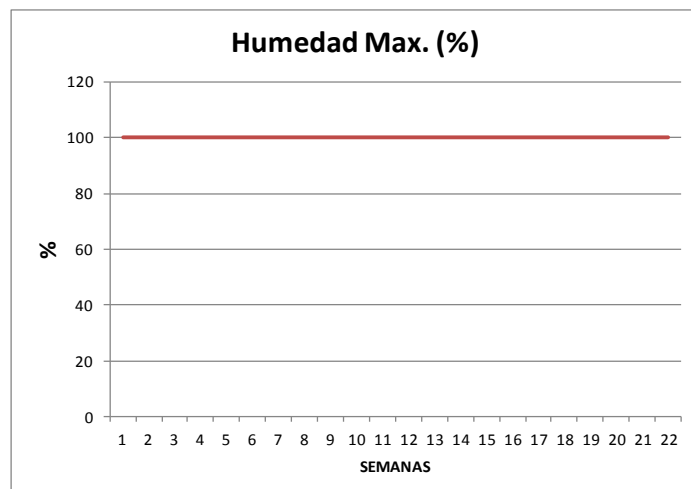
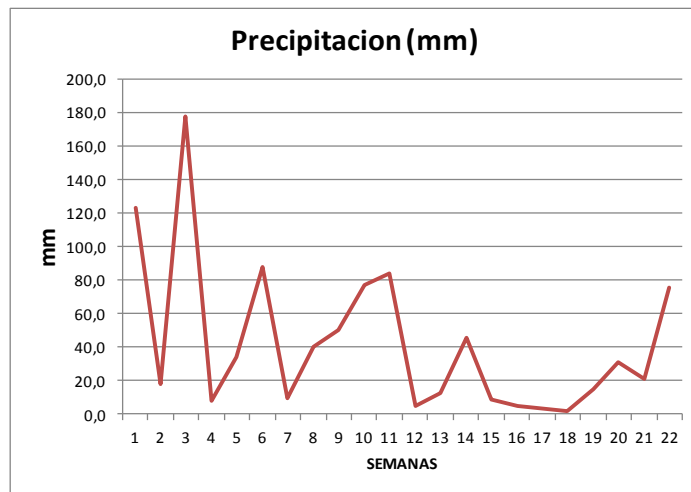
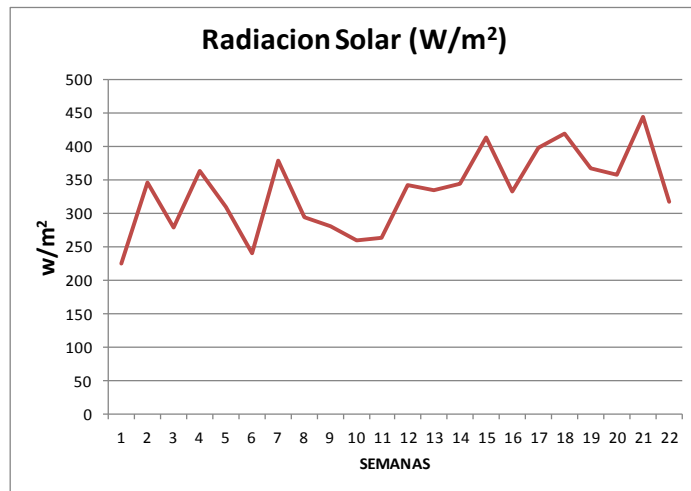
ANEXO 1. Variables climatológicas durante el periodo experimental.

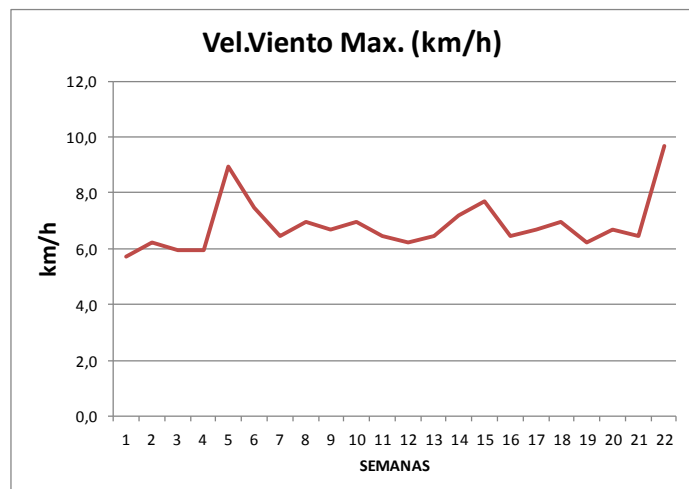
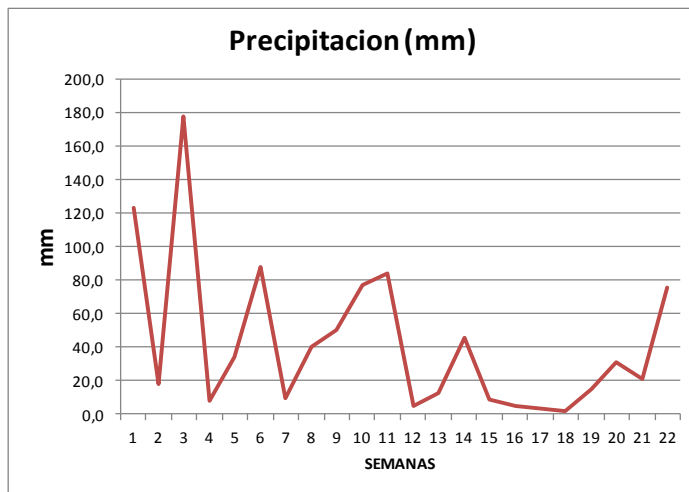
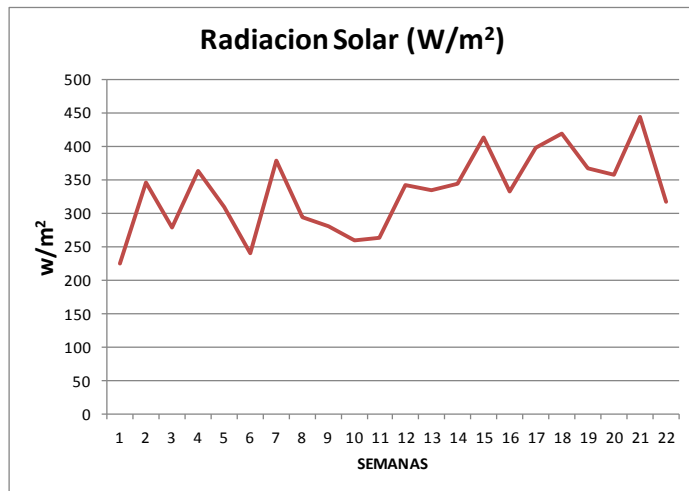
Variables climatológicas promedio por semana para el período experimental (semana 46, 2013 a semana 15, 2014). Estación meteorológica de La Rita de Guápiles, cantón de Pococí, provincia de Limón. Programa BANACLIMA-CORBANA.

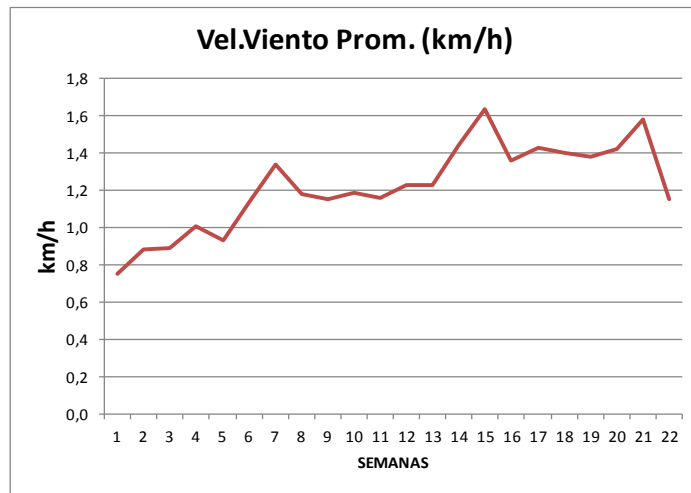
Semana	Temp. Max. (C°)	Temp. Min. (C°)	Temp. Prom. (C°)	Humedad Prom. (%)	Humedad Min. (%)	Humedad Max. (%)	Radiación Solar (W/m ²)	Precipitación (mm)	Vel.Viento Max. (km/h)	Vel.Viento Prom. (km/h)
46	32,1	21,4	25,2	95,0	60,7	100	223,77	123,0	5,7	0,8
47	32,9	20,2	25,8	89,9	54,0	100	344,72	18,1	6,2	0,9
48	32,3	20,9	24,8	93,6	59,5	100	277,88	177,5	6,0	0,9
49	32,3	19,7	25,5	88,4	55,4	100	362,11	8,1	6,0	1,0
50	32,5	19,9	25,0	91,1	57,7	100	308,07	33,9	9,0	0,9
51	31,7	20,2	24,3	92,8	57,7	100	239,14	87,6	7,5	1,1
52	31,8	18,0	24,7	86,3	49,2	100	378,87	9,1	6,5	1,3
1	32,1	20,2	24,9	91,3	52,9	100	293,55	40,1	7,0	1,2
2	31,5	19,9	24,7	90,6	60,2	100	280,32	50,2	6,7	1,2
3	32,0	19,0	23,9	92,5	54,0	100	259,38	77,0	7,0	1,2
4	30,9	19,4	23,8	93,3	53,7	100	262,06	83,7	6,5	1,2
5	31,6	17,2	23,9	85,9	47,3	100	341,38	4,5	6,2	1,2
6	32,1	18,0	24,2	87,5	50,8	100	334,92	12,6	6,5	1,2
7	32,3	20,4	25,3	89,2	57,7	100	344,51	45,8	7,2	1,4
8	32,1	17,8	24,5	84,9	50,7	100	411,84	8,9	7,7	1,6
9	31,7	18,7	25,0	86,8	52,4	100	332,5	4,6	6,5	1,4
10	33,0	19,4	25,2	84,4	50,9	100	397,08	3,0	6,7	1,4
11	33,0	18,6	25,3	83,5	46,8	100	417,83	1,8	7,0	1,4
12	32,6	19,4	25,0	86,2	54,1	100	366,12	15,1	6,2	1,4
13	32,2	19,6	25,4	87,3	53,4	100	357,26	31,2	6,7	1,4
14	32,8	18,7	25,8	84,6	43,3	100	443,96	20,9	6,5	1,6
15	32,9	21,5	26,0	90,4	56,3	100	316,71	75,5	9,7	1,2
PROMEDIO	32,2	19,5	24,9	88,9	53,6	100	331,54	42,4	6,8	1,2











ANEXO 2. Protocolo para el recuento de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) de hongos, bacterias y actinomicetes totales (Recuento de Viables).

OBJETIVO: Este análisis permite cuantificar la cantidad de microorganismos (hongos filamentosos y levaduriformes totales, bacterias totales y actinomicetes totales) en términos de Unidades Formadoras de Colonia (UFC), presentes en determinada muestra sólida ó líquida.

METODOLOGÍA

- Bajo condiciones de asepsia, suspender 10g de la muestra (representativa) en 100ml de Solución Salina Estéril (SSE) al NaCl 0,9% de (peso/vol). Para muestras líquidas, medir 10ml de la muestra y suspenderlos en 90 ml de SSE.
- Homogenizar la mezcla en un agitador magnético por espacio de 5 min.
- Realizar diluciones seriadas hasta a la dilución 10^{-6} . Para la dilución emplear (SSE).
- PARA OBTENER HONGOS TOTALES: Inocular 100 μ L de la dilución 10^{-3} en una placa petri que contiene medio Papa–Dextrosa–Agar (PDA) acidificado a pH 4,8.
- PARA OBTENER ACTINOMICETES TOTALES: Inocular 100 μ L de la dilución 10^{-4} en platos petri conteniendo medio Agar-Actinomycecte (AA).
- PARA OBTENER BACTERIAS TOTALES: Inocular 100 μ L de la dilución 10^{-6} en platos petri conteniendo medio Agar Nutritivo (AN).
- INCUBACIÓN (en completa oscuridad): HONGOS: incubar los platos por espacio de 72-96 horas a 26°C; BACTERIAS Y ACTINOMICETES: incubar por espacio de 24-48 horas a 30°C.
- Para obtener la cantidad de UFC/g o UFC/ml en la muestra, sustituir el dato promedio en la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/g} = \frac{10 \times \bar{X}_{\text{UFC}(100\mu\text{L})} \times \text{FD} \times \text{VOL SM(ml)}}{\text{PESO MUESTRA (g)}}$$

$$\text{UFC/ml} = \frac{10 \times \bar{X}_{\text{UFC}(100\mu\text{L})} \times \text{FD} \times \text{VOL SM(ml)}}{\text{VOLUMEN MUESTRA (ml)}}$$

Donde: $\bar{X}_{\text{UFC}(100\mu\text{L})}$ es el número de colonias por plato o en 100 μL .

FD es el Factor de Dilución.

VOL SM (ml) es el volumen total de la Solución Madre (100ml).

PESO MUESTRA (g) es aproximadamente 10g.

VOLUMEN DE MUESTRA (ml) es aproximadamente 10ml.

COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO (POR LITRO)

MEDIO DE CULTIVO	MICROORGANISMO	COMPOSICIÓN/L
Papa-Dextrosa-Agar (PDA) acidificado	Hongos y levaduras	Disolver en agua caliente 38g de producto comercial que contiene (15g agar, 20g dextrosa y 4g extracto de papa) en polvo. Una vez disuelto, mezclar con 10ml/L de ácido málico al 1% y dispensar. pH final 5.6 \pm 0.2 (37 C)
Agar-actinomicete (AA)	Actinomicetes	Disolver en agua caliente el medio preparado que contiene 15g agar, 0.1g L-asparagine, 0.5g fosfato dipotásico, 0.001g sulfato ferroso, 0.1g sulfato de magnesio, 2g caseinato de sodio y 4g propionato de sodio. Agregar 5g de glicerol/L. pH final 8.1 \pm 0.2 (25 C)
Agar nutritivo (AN)	Bacterias aerobias	Disolver en agua caliente 15g agar, 1g extracto de carne, 5g peptona, 5g cloruro de sodio, 2g extracto levadura. Medio casero: 5g peptona bacteriológica y 3g extracto carne. pH final 7.1 \pm 0.2 (37 C)

ANEXO 3. Técnica de Conservación de bacterias esporulantes mediante crioconservación y papel filtro.

1. CRIOCONSERVACIÓN EN SUSPENSIÓN CON GLICEROL.

- Utilizar cultivos bacteriales puros, que se encuentren al inicio de su etapa estacionaria, pues es en esta en la cual se da la producción de esporas que son estructuras que resisten condiciones extremas.
- Bajo condiciones de asepsia (dentro de una cámara de flujo laminar), con la ayuda de una espátula, cosechar colonias de la bacteria y transferirlas a un criotubo de polipropileno de 3ml capacidad con tapa de rosca hermética, el cual contiene una solución estéril de glicerol al 20%. Rotular con fecha y código del aislamiento.
- Para evitar pérdidas de viabilidad por constantes descongelamientos y congelamientos, hacer al menos 3 réplicas y utilizar únicamente un criotubo para los sucesivos subcultivos.
- Homogenizar la mezcla mediante agitación utilizando un agitador de tubos de ensayo (vórtex), por espacio de 2 minutos. Dejar en reposo a temperatura ambiente por espacio de una hora para permitir un buen acondicionamiento con el glicerol.
- Introducir los criotubos dentro de contenedores y rotularlos para hacer más fácil su posterior identificación. Introducir los contenedores dentro del congelador (freezer) a -80°C .

2. DISCOS DE PAPEL FILTRO.

- Utilizar cultivos bacteriales puros, que se encuentren al inicio de su etapa estacionaria, pues es en esta en la cual se da la producción de esporas que son estructuras que resisten condiciones extremas.
- Bajo condiciones de asepsia (dentro de una cámara de flujo laminar) y a temperatura de laboratorio (25°C), con la ayuda de una espátula, cosechar colonias de la bacteria y transferirlas a un tubo "ependorf" de 1ml de capacidad, conteniendo igual volumen de solución salina estéril al 0,9% (NaCl).

- Homogenizar la mezcla mediante agitación utilizando un agitador de tubos de ensayo (vórtex), por espacio de 2 minutos.
- Inmediatamente después, con la ayuda de una pinza, introducir uno a uno dentro del tubo eppendorf, 10 discos estériles de papel filtro (Whatman #3) de 0,5cm de diámetro y mantener agitación manual por espacio de un minuto.
- Extraer uno a uno los discos y depositarlos dentro de un sobre pequeño de papel absorbente estéril previamente rotulado. Dejar en reposo los sobres por espacio de 30 minutos dentro de la cámara de transferencia para secarlos.
- Transferir los sobres a una cámara de secado con sílica gel por espacio de 48 horas para asegurar un secado completo de los discos.
- Transferir los sobres a recipientes herméticos y almacenarlos a -20°C (congelador de la refrigeradora).

ANEXO 4. Tinciones bacterianas.

TINCIÓN SIMPLE.

OBJETIVO: La tinción simple se utiliza para mejorar la observación de endósporas al microscopio, debido al contraste que permite.

- Utilizar cultivos bacteriales puros, que se encuentren al inicio de su etapa estacionaria, pues en esta se da la producción de esporas.
- Tomar un portaobjetos limpio y pasarlo suavemente por la llama del mechero para eliminar partículas de polvo y otras impurezas. Trazar con un marcador permanente, del lado contrario a donde se va a depositar la muestra, un círculo de aproximadamente 1cm de diámetro. Este servirá de guía para depositar y extender la muestra.
- Depositar una gota de agua estéril e inmediatamente con la ayuda de un asa bacteriológica, depositar una pequeña porción de una colonia pura y aislada de la bacteria incógnita. Homogenizar bien la mezcla y extenderla sobre los límites marcados (frotis).
- Fijar la muestra mediante calor, pasando leve y repetidamente la superficie opuesta sobre la llama. Detener este proceso cuando la muestra haya secado mala utilizando el asa. Evitar contacto directo con la llama y sobrecalentar la muestra pues esto cambia las características de las células.
- Una vez haya alcanzado la temperatura ambiente, cubrir la preparación con el colorante Cristal Violeta y dejar descansar por un minuto.
- Decantar el exceso de colorante y lavar levemente (gota a gota) con agua de tubo, hasta que el colorante deje de salir profusamente de la preparación.
- Dejar secar al aire y observar a 100X de poder, utilizando acetite de inmersión.

TINCIÓN DE GRAM.

OBJETIVO: mediante esta tinción se distinguen 2 grupos de células: las que retienen el tinte Cristal Violeta (colorante primario), que son las clasificadas como Gram-positivas y que muestran una coloración morado-azul; y las que pierden el colorante primario y absorben el colorante secundario (safranina), mostrando un color rojizo a rosado; estas se clasifican como Gram-negativas. *Bacillus* es un género de bacterias Gram-positivas.

- Utilizar cultivos bacteriales puros, que se encuentren al inicio de su etapa estacionaria, pues en esta se da la producción de esporas.
- Tomar un portaobjetos limpio y pasarlo suavemente por la llama del mechero para eliminar partículas de polvo y otras impurezas. Trazar con un marcador permanente, del lado contrario a donde se va a depositar la muestra, dos círculos de aproximadamente 1cm de diámetro cada uno. Estos servirán de guía para depositar y extender las muestras de: bacteria incógnita (lado derecho) y la muestra de referencia (lado izquierdo) compuesta por una mezcla de dos bacterias Gram-negativas: un coco y un bacilo. Estas servirán para comparar y tener mayor certeza del tipo de célula de la muestra incógnita.
- Depositar una gota de agua estéril dentro del área de cada círculo, e inmediatamente después, con la ayuda de un asa bacteriológica, depositar una pequeña porción de la muestra incógnita. Hacer lo mismo en el otro círculo con las bacterias de referencia. Homogenizar y extender bien las mezclas (frotis).
- Fijar la muestra mediante calor, pasando leve y repetidamente la superficie opuesta sobre la llama. Detener este proceso cuando la muestra haya secado mala utilizando el asa. Evitar contacto directo con la llama y sobrecalentar la muestra pues esto cambia las características de las células.

- Una vez haya alcanzado la temperatura ambiente, cubrir la preparación con el colorante Cristal Violeta y dejar descansar por un minuto.
- Decantar (no lavar) el Cristal Violeta y cubrir con Gram yodo y esperar un minuto.
- Lavar suavemente con alcohol acetona, hasta que casi no emane un color azulado de la muestra (decoloración).
- Sacudir levemente para evaporar el alcohol acetona y cubrir el frotis con Safranina. Esperar un minuto.
- Decantar el exceso de colorante y lavar levemente (gota a gota) con agua de tubo, hasta que el colorante deje de salir profusamente de la preparación.
- Dejar secar al aire y observar a 100X de poder, utilizando acetite de inmersión.

ANEXO 6. Patrón de Turbidez 0,5 Escala de Mc Farland

1. PREPARACIÓN DEL PATRÓN:

- Trabajar en cámara de extracción de gases y usar toda la indumentaria de protección (gabacha, guantes, mascarilla y anteojos).
- Medir con pipeta 1,807 ml de ácido sulfúrico y aplicarlo muy lentamente con agitación en un balón aforado de 100 ml con 50 ml de agua destilada estéril. Asegurarse de que la mezcla sea completa y aforar a la marca. Queda lista la solución al 0,18 molar.
- Medir 0,996 g de cloruro de Bario y depositarlo en un balón de 100 ml con 50 ml de agua destilada estéril dando agitación. Asegurarse de que la mezcla sea completa y aforar a la marca. Queda lista la solución al 0,048 molar.
- Pipetear 0,5 ml de la solución de cloruro de Bario 0,048 molar y depositarla en un balón aforado de 100 ml.
- Pipetear 99,5 ml de la solución de ácido sulfúrico 0,18 molar y depositarla lentamente con agitación constante en el balón 100 ml que contiene el cloruro de bario.
- Mezclar bien hasta que la mezcla esté homogénea.
- Transferir 60ml de la mezcla a tubos de ensayo de 75ml de capacidad que limpios y rotular "Mc Farland" y la fecha manufactura de la solución.
- Guardar tubos en refrigeración a 5-8°C.

2. EQUIPARACIÓN DEL PATRÓN

- Colocar lado a lado en una gradilla, el tubo de Mc Farland y el tubo que recibirá la bacteria a equiparar, el cual contiene 60ml de solución Salina Estéril (SSE) al 0,9% (NaCl). Colocar una hoja blanca rayada con líneas

gruesas de color negro; esto será útil para visualizar cuándo ambos tubos de ensayo alcanzaron la misma turbidez.

- Preparar una suspensión concentrada de la bacteria a equipar. Utilizar cultivos puros y frescos. En condiciones de asepsia (dentro de una cámara de flujo laminar), raspar las colonias con la ayuda de una espátula y transferirlas a un tubo de ensayo de 25ml de capacidad, conteniendo 10ml de SSE.
- Homogenizar la mezcla mediante agitación en un vórtex, por espacio de dos minutos.
- Inmediatamente después, con la ayuda de una micropipeta, gotear en el tubo con SSE, la suspensión concentrada de la bacteria e ir contabilizando el volumen necesario hasta que se observe la misma turbidez. Durante el proceso mantener agitación a ambos tubos.
- El volumen final que corresponde a los 60ml de SSE, más el volumen de la suspensión concentrada, será necesario para calcular el volumen de la suspensión de la bacteria que se va a necesitar aplicar en el experimento.