

Bacterias antagonistas del nematodo de quiste de la soya, *Heterodera glycines*, aisladas de un suelo en Puerto Rico

Por

PAULA ROSADO DÍAZ

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

en

PROTECCIÓN DE CULTIVOS

**UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ
2014**

Aprobado por:

_____ Govind S. Nadathur, Ph. D. Miembro, Comité Graduado	_____ Fecha
_____ Elide Valencia, Ph. D. Miembro, Comité Graduado	_____ Fecha
_____ Roberto Vargas Ayala, Ph. D. Presidente, Comité Graduado	_____ Fecha
_____ Elvin Roman Paoli Ph. D. Director Interino de Departamento	_____ Fecha
_____ Duane A. Kolterman, Ph. D. Representante de estudios graduados	_____ Fecha

ABSTRACT

Soy bean cyst nematode (*Heterodera glycines*) was reported in Puerto Rico in 1999. This represents a threat to the cultivation of soybean *Glycine max*. Although the parasite is in one location, it is necessary to know if there are natural enemies that could exert some control of the nematode on the island. The purpose of this research was to find biocontrol agents in Puerto Rican soil with the ability to control root nematode infection. For the selection of potential biocontrol agents the King B test was performed in order to find strains of *Pseudomonas* which has been catalogued with antagonistic properties. After reviewing certain physiological characteristics of soybean cyst nematode (SCN), between these layers comprising chitin and vitellin body, two generous of bacteria with degradative properties of these compounds in vitro tests were selected. These properties were confirmed by growing the bacteria in chitin and casein media respectively. These were identified, using the sequencing method of the 16S ribosomal DNA region, such as *Pseudomonas* sp. NJ-22. and *Serratia marcescens*, both used in previous studies for the control of *Meloidogyne* spp. in bean plants. In this research, the bacteria *Pseudomonas* sp. NJ-22 met the requirements to control nematode infection at the root of soybean cultivar Lee 74 without harming the plant. However, it did not prevent severe infection in direct contact with larvae and eggs. *Serratia marcescens* was not effective to prevent infection by J2 larvae of roots of soybean plants, however, effective growth and colonization on eggs and larvae of SCN were observed. In conclusion, both bacteria act differently in controlling the nematode, although it would be necessary to elaborate these findings for use at field level.

RESUMEN

El nematodo de quiste de la soya (*Heterodera glycines*) se reportó por primera vez en Puerto Rico en el año 1999. Desde esa fecha, este nematodo representa una amenaza al cultivo de la soya, *Glycine max*. A pesar que el parásito se encuentra en una sola localidad, es necesario conocer si en la isla existen enemigos naturales que ejerzan cierto control del nematodo. El propósito de esta investigación fue muestrear y estudiar posibles bacterias biocontroladores del nematodo, en suelo puertorriqueño, con características antagonistas sobre el nematodo de quiste de la soya (NQS). Para la selección de posibles agentes biocontroladores se realizó la prueba de King B, con el fin de encontrar alguna cepa de *Pseudomonas* lo cual la catalogan con propiedades antagonistas. Luego de conocer ciertas características fisiológicas del nematodo *Heterodera glycines*, entre éstas las capas de quitina y vitelina que componen su cuerpo, se seleccionaron dos géneros de bacterias con propiedades degradadoras de estos compuestos en pruebas in vitro. Se corroboraron estas propiedades cultivando las bacterias en medio de quitina y de caseína respectivamente. Estas se identificaron, utilizando el método de secuenciación de la región 16S del ADN ribosomal, como *Pseudomonas* sp. NJ-22. y *Serratia marcescens*, ambas utilizadas en estudios previos para el control de *Meloidogyne* spp. en plantas de habichuela. En esta investigación la bacteria *Pseudomonas* sp. NJ-22., cumplió con los requisitos de controlar la infección del nematodo a la raíz de plantas de soya cultivar Lee74 sin hacerle daño a la planta. Sin embargo, no presentó infección severa en el contacto directo con larvas y huevos. *Serratia marcescens*, no fue efectiva evitando la infección de larvas J2 a las raíces de plantas de soya, sin embargo se observó crecimiento y colonización de ésta en huevos y larvas de NQS. En conclusión, ambas bacterias actúan de manera diferente controlando el nematodo, aunque sería

necesaria la profundización de estos hallazgos para ser utilizados a nivel de campo.

DEDICATORIA

Mi tesis. Pienso que Todo el que pasa por esta experiencia tiene diversas emociones y razones por las cuales la realiza, muchas compartidas otras bien personales.

Por mi parte, esto es un paso adelante que aunque parezca fácil, envuelve muchos factores tanto científicos como situaciones cotidianas que no están directamente, relacionadas pero afectan. Dentro de un carro en movimiento siempre existe un motor que lo hace mover y es este al que cuidamos porque sin funcionar no nos podemos mover. En mi carro mi motor es algo complicado las piezas son muchas e importantes e indispensables! Puedo ser egoísta y decir que hago mi maestría para mi desarrollo profesional y enriquecimiento intelectual pero, la verdad es que hay mucho más detrás de este trabajo.

En especial:

Mis padres quienes aunque a veces no quiera escucharlos por un rato son quienes me han empujado y apoyado a terminar este trabajo. Son quienes han estado allí desde el principio de mi carrera y mi vida. Los sermones a veces cansan pero se quedan en el subconsciente y quien tiene consciencia y sentido común lo sabe apreciar y utilizar en el momento adecuado.

A mi hija hermosa que la amo con el alma, sentimiento que solo lo conoce quien es padre, es la responsabilidad de protección, de enseñanza, de saber que te miran como su héroe y debes serlo siempre aunque a veces no lo sepan! Ella acapara toda mi atención y no me deja trabajar mucho, pero la razón de existir es suficiente para dedicarle mi vida!

A mi amigo, compañero, esposo...Luis Alameda "Lito", quien llego en el momento indicado, ¡Dios sabe lo que hace! Quien me apoya incondicionalmente y se mata sol a sol trabajando para poder darme el espacio y el tiempo que necesito para terminar. Quien me ayudó en mis exámenes aprendiendo por primera vez con ánimo lo que eran nematodos y quien se intereso por mis intereses. Quien me acompaña y me da el amor que nos merecemos y es un padre incondicional lo cual nos hace una familia bendecida, feliz y agradecida con Dios.

Y a mi Dios quien no menos importante es quien me llena de amor, fuerza y vida para continuar, quien sabe cada parte de mi vida y me ilumina en cada paso de ella. Hasta en los momentos más oscuros siento su luz.

AGRADECIMIENTOS

A parte de todos a quien le dedique este trabajo, quiero agradecer:

A mi papa William Rosado, quien saco de su tiempo para enseñarme técnicas de microbiología y me ayudó incondicionalmente en mi investigación.

A Govind Nadathur por confiar en mí y ser parte de mi comité, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo en el laboratorio de microbiología y dejarme usar los instrumentos requeridos para terminar mi trabajo. Por ayudarme en ideas de solucionar problemas con las bacterias y compartir su conocimiento con migo.

A Roberto Vargas, por también confiar en mi juicio y permitir manejar mi investigación, aunque un poco cuesta arriba, pero también ayudó con consejos y su conocimiento a la investigación.

A Elide Valencia, por formar parte de mi comité y brindarme materiales cuando los necesitaba.

A Nieves Rivera, tanto que la molesté, gracias siempre por ayudarme a conseguir semillas de soya Lee 74.

A mis compañeras de laboratorio, Odaliz Faria, Denisse Rivera y Yolima Arenas, por colaborar en el recogido de muestras y apoyo moral.

A mi suegra Minerva Rodríguez, mi madre Marissa Díaz y mi esposo Lito, por ayudarme en el cuidado de Camili en lo que trabajaba en la tesis.

Al proyecto USDA CSREES TSTAR 131 por costearme la mayoría de los gastos de mi investigación.

A Luis Collado técnico de laboratorio, por ayudarme con el autoclave y cuando necesite materiales que estaban bajo su tutela.

¡Gracias a TODOS que de una manera u otra pusieron su granito para poder terminar esta obra!

Tabla de Contenido

LISTA DE TABLAS	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE APÉNDICES	xiv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 Descripción de la planta	4
2.1.2 Importancia de la soya.....	4
2.2 Plaga principal de la soya: <i>Heterodera glycines</i>	5
2.2.1 Sintomatología del nematodo de quiste.....	6
2.2.2 Razas de <i>Heterodera glycines</i>	6
2.2.3 Hospederos alternos.....	7
2.3 Prácticas de control	7
2.3.1 Prácticas de control biológico.....	8
3. MATERIALES Y METODOS	12
3.1 Recolección de muestras de suelo para aislar bacterias	12
3.2 Criterios de selección de bacterias	13
3.2.1 Actividad quitinolítica	13
3.2.2 Degradación de proteasas	14

3.2.3 Curva de crecimiento bacteriano	15
3.3 Identificación molecular.....	15
3.3.1 Extracción de ADN	15
3.3.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	16
3.3.3 Clonación y secuenciación	17
3.4 Extracción de Nematodos.....	18
3.5 Evaluación de posibles agentes biocontroladores ante la infección <i>H. glycines</i> en raíces de soya.....	20
3.5.2 Preparación de los inóculos de bacteria.....	21
3.5.2 Preparación de los inóculos de larvas de NQS	21
3.5.3 Datos recolectados	22
3.6 Bioensayo de antagonismo: Efecto de las bacterias a huevos y larvas de <i>H. glycines</i>	22
4. RESULTADOS.....	24
4.1 Muestreo y Aislamiento de bacterias	24
4.2 Criterios de evaluación a bacterias.....	24
4.2 Identificación molecular.....	27
4.2.1 Caracterización molecular de las bacterias B6 y B10	29
4.3 Curvas de crecimiento bacteriano	30
4.4 Extracción de nematodos	34

4.5 Evaluación de la capacidad controladora de las bacterias (B10) y (B6) ante la infección de larvas J2 de <i>Heterodera glycines</i> en plantas de soya.	35
4.5.1 Efecto de los tratamientos en el peso de las raíces y en el peso fresco de las plantas	35
4.5.2 Efecto de los tratamientos en la altura de las plantas de soya	36
4.5.3 Efecto de tratamientos en el desarrollo visible de las plantas	37
4.5.4 Efecto de los tratamientos en la infección de larvas a raíces con el método de tinción	38
4.6 Evaluación de daño hacia huevos y larvas de <i>H. glycines</i> por parte de las bacterias <i>Serratia marcescens</i> y <i>Pseudomonas</i> sp. NJ-22.....	41
4.6.1 Interacción de huevos, larvas y quistes de <i>H. glycines</i> con la bacteria <i>Serratia marcescens</i>	41
4.6.2 Interacción de huevos, larvas y quistes de <i>H. glycines</i> con la bacteria <i>Pseudomonas</i> sp NJ-22.	45
5. DISCUSIÓN	48
6. CONCLUSIONES	51
7. RECOMENDACIONES.....	52
8. LITERATURA CITADA	53

LISTA DE TABLAS

Tablas	Páginas
Tabla 1. Pruebas a bacterias aisladas para comprobar criterios de evaluación.....	25
Tabla 2. Medidas de absorbancia para <i>Serratia marcescens</i> y <i>Pseudomonas</i> sp. NJ-22.....	31
Tabla 3. Resultado de análisis LSD al nivel de infección de larvas de <i>H. glycines</i> a raíces con tratamientos de bacteria.	38

LISTA DE FIGURAS

Figuras	Páginas
Figura 1. Producción de fluorescencia en medio King B.	25
Figura 2. Halos de degradación en medio de quitina. (A) Bacteria 10, (B) Bacteria 6	26
Figura 3. Gel de agarosa para la identificación y diferenciación de cepas bacterianas aisladas..	27
Figura 4. Gel de agarosa para la determinación de diferencias entre bacterias haciendo una digestión enzimática con Sau 3A.....	28
Figura 5. Gel de agarosa para corroborar el inserto del producto del PCR en el vector pGEM® - T Easy.	29
Figura 6. Curva de crecimiento de <i>Pseudomonas</i> sp. NJ-22.	32
Figura 7. Curva de crecimiento para <i>Serratia marcescens</i>	33
Figura 8. Extracción de nematodos.....	34
Figura 9. Efecto de los tratamientos en el peso de la raíz y peso fresco de las plantas..	35
Figura 10. Efecto de los tratamientos en la altura de las plantas de soya.	36
Figura 11. Tratamiento control en plantas de soya.	37
Figura 12. Efecto de las bacterias en la infección del nematodo a la raíz de soya. .	38
Figura 13. Tinción de raíces con tratamiento control. No se observan daños visibles en el aspecto de las larvas ni dificultad a su infección en la raíz.	39
Figura 14. Tinción de raíces teñidas presentando la infección de larvas de <i>H. glycines</i> a plantas tratadas con la bacteria <i>Serratia marcescens</i> (B6)	40
Figura 15. Tinción de raíz con el tratamiento B10. .	41
Figura 16. Infección de <i>Serratia marcescens</i> en huevos de <i>H. glycines</i> 100X.....	43

Figura 17. Infección de <i>Serratia marcescens</i> a larvas de <i>H. glycines</i>	44
Figura 18. Quiste de <i>H. glycines</i> que estuvo en contacto directo con <i>Serratia marcescens</i> por 5 días.	45
Figura 19. Huevos y larvas en interacción con la bacteria <i>Pseudomonas sp. NJ-22</i>	46
Figura 20. Quiste de <i>H. glycines</i> luego de 5 días en interacción con <i>Pseudomonas sp. NJ-22</i>	47

LISTA DE APÉNDICES

Apéndices	Páginas
APÉNDICE 1: Secuencias de bacterias	56
APÉNDICE 2: ANOVAS	61
APÉNDICE 3: M9 Minimal medium recipe	66

1. INTRODUCCIÓN

La soya, *Glycine max* (L.) Merrill, se encuentra entre los cultivos de mayor importancia y producción a nivel mundial (Ponce et al., 2002). Este es un cultivo rico en aceite y proteínas usado tanto en consumo animal como humano y en propósitos industriales como el biocombustible. El cultivo de la soya también juega un rol importante en la diversificación y beneficio a la agricultura por la adición de nitrógeno en el suelo en un sistema de rotación (Guriqbal, 2010). El origen de producción de soya fue en China; éste fue el mayor productor de soya durante la primera mitad del siglo 20. Para el año 2012, Estados Unidos fue el segundo país mayor productor de soya a nivel mundial, seguido de Brasil, reportando una producción anual de aproximadamente 3.068 billones de “búshels” (The American Soybean Association., 2013). En el 2012, la soya representó un 57% de la producción total de aceite en el mundo (The American Soybean Association., 2013). En Puerto Rico, su producción se estima en 700 hectáreas, localizadas en las áreas sur y noroeste, distribuidas en seis compañías dedicadas a la selección de líneas mejoradas y producción de semilla para mejoramiento. La producción de soya puede establecerse durante todo el año, debido a que las estaciones (especialmente el invierno) no son marcadas, lo que es una ventaja para las empresas productoras de semilla, que requieren de una producción constante durante todo el año (Vega, 2009).

El cultivo de soya es atacado por plagas, las cuales comprenden nematodos, hongos, bacterias, virus e insectos. La plaga de mayor impacto en el cultivo de soya es el nematodo

Heterodera glycines Ichinoe (NQS). En Estados Unidos se han reportado pérdidas de hasta 1 billón de dólares al año (The American Soybean Association., 2013). El NQS representa una amenaza a la producción mundial de soya, debido a que su manejo o erradicación ha sido ineficiente. Estudios se han realizado con el fin de encontrar métodos de control; entre ellos se encuentra el uso de variedades resistentes, la rotación de cultivos, el uso de nematicidas, entre otros. En la actualidad el uso de nematicidas, aunque efectivo, ha sido cuestionado por su efecto nocivo al ambiente. Es por esta razón que surgen ideas de implementar alternativas biológicas de control, ya que al usar organismos naturales no causa efectos secundarios mayores y preserva al ambiente.

2. OBJETIVOS

El propósito de esta investigación fue aislar bacterias con características antagonistas sobre el nematodo de quiste de la soya (*Heterodera glycines*). Identificar la especie mediante la técnica de secuenciación del gen ribosomal 16S y determinar el mecanismo de respuesta antagonista en pruebas de laboratorio.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Descripción de la planta

La soya (*Glycine max*), es una leguminosa perteneciente a la familia Fabaceae. Este cultivo es sembrado en todas las zonas desde lugares tropicales y subtropicales hasta zonas templadas. La soya es una planta que responde a fotoperiodos cortos, lo que determina las áreas geográficas de adaptación. Las variedades de soya están agrupadas en 13 grados de maduración, dependiendo de la latitud y el clima al cual están adaptadas. Las semillas germinan cuando el suelo alcanza una temperatura de 10°C y emergen en un periodo aproximado de 5-7 días en condiciones favorables.

2.1.2 Importancia de la soya

Constituye uno de los diez cultivos de mayor importancia económica a nivel mundial, por ser la fuente más importante de concentrados proteicos y aceite vegetal. Como leguminosa, es capaz de asociar su sistema radicular con bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico para la biosíntesis de moléculas aminadas, como bases nitrogenadas, aminoácidos y coenzimas, reduciendo la utilización de fertilizantes nitrogenados sintéticos (Ponce et al., 2002). La soya es un cultivo de alto valor y rentabilidad. La viabilidad económica de la producción de soya está determinada por la comercialización de los subproductos derivados de la misma, entre estos, comida y aceite en los cuales cuentan con dos y una tercera parte del valor económico del cultivo, respectivamente. Alimentos derivados de la soya son generalmente considerados como nutritivos y saludables en base a su composición de nutrientes que incluye proteínas, grasas,

carbohidratos, fibras dietéticas, así como minerales y fitoestrógenos (isoflavonas). Estudios científicos recientes asocian el consumo de dietas ricas en fitoestrógenos, con un menor riesgo a enfermedades coronarias, la osteoporosis, el cáncer y los síntomas menopáusicos. (Dwevedi y Kayastha, 2011).

2.2 Plaga principal de la soya: *Heterodera glycines*

El nematodo del quiste de la soya (NQS), es la principal plaga de la soya en el mundo (Opperman y Bird, 1998). Este nematodo es un endoparásito sedentario obligado con reproducción cruzada. Este cumple con seis etapas en su ciclo de vida: el huevo, cuatro estadios larvales y adulto con dimorfismo sexual (Chen et al., 2001). La etapa infectiva es el segundo estado larval, ya que penetra las raíces de la planta hospedera y migra cerca de los cilindros vasculares donde se desarrolla un complejo alimenticio. La diferenciación sexual también ocurre en las últimas etapas de estados larvales. Los nematodos machos migran fuera de la raíz a los 10 o 15 días luego del apareamiento con la hembra. Al madurar la hembra, su cabeza queda adherida al sitio de alimentación en la raíz y el cuerpo sale de la raíz quedando expuesto a la rizósfera (Chen et al., 2001). Una vez el nematodo hembra se establece cumple su ciclo de vida de forma parásita sedentaria. La hembra produce alrededor de 200-400 huevos, los cuales quedan protegidos por la corteza dura que se forma al morir, llamada quiste (Opperman y Bird, 1998). Dentro de los huevos se forma el primer estadio larval y se produce la primera muda antes de alcanzar el estado en el cual eclosionan. La producción de huevos es un proceso muy perjudicial para la planta infectada. La formación de éstos supone una gran demanda de agua, nutrientes y fotoasimilatos (Fenoll y Campo, 1998).

Cada ciclo de vida tiene una duración de 25 – 40 días y pueden ocurrir varias generaciones por época. Los huevos dentro del quiste pueden sobrevivir por años en condiciones adversas, lo cual complica las estrategias de control ante el mismo (Chen et al., 2001).

2.2.1 Sintomatología del nematodo de quiste

Esta plaga ataca las raíces del cultivo, disminuyendo su capacidad para absorber agua y nutrientes; en consecuencia, las plantas reducen su crecimiento y finalmente el rendimiento. Sin embargo, debido a que provoca síntomas inespecíficos, frecuentemente su presencia pasa desapercibida (Gamundi et al., 2002). No existe un síntoma específico del nematodo de quiste de soja y es común confundirlo con problemas de suelo, deficiencia de nutrientes, algunas enfermedades, efecto de herbicidas, etc. En infestaciones severas, se observan parchos dentro del predio donde las plantas detienen su crecimiento; se tornan amarillentas y pierden sus hojas anticipadamente. Además, se observa una cantidad abundante de raíces laterales, muchas de ellas muertas y escasa formación de nódulos fijadores de nitrógeno (Gamundi et al., 2002).

2.2.2 Razas de *Heterodera glycines*

Se cree que la diversidad de razas de *Heterodera glycines*, se desarrollan al lograr infectar con cultivares resistentes de soja (Kim et al., 1997). Estas variedades requieren de rotación de cultivos para que la resistencia sea efectiva al ataque del nematodo. Aparentemente, éstos tienen la habilidad de mutar y desarrollar nuevos genes responsables de romper la resistencia e infectar la planta. Esto ocurre mayormente al utilizar la técnica de monocultivo, ya

que de alguna manera para poder sobrevivir se adaptan al hospedero y logran romper la resistencia de estas variedades logrando así, alimentarse y desarrollarse. Hasta el momento se han reportado 16 razas de *Heterodera glycines* (Palmateer et al., 2000). Por lo general, los genotipos utilizados para los estudios de resistencia y determinación de nuevas razas del nematodo son ‘Peking’, ‘Pickett’, PI 88788 y PI 9076; estos son estudiados en conjunto con las variedades susceptibles Lee y Essex (Riggs et al., 1991).

2.2.3 Hospederos alternos

El SCN también puede reproducirse sobre otros cultivos como arveja (*Pisum sativum*), caupí (*Vigna unguiculata*) y habichuela (*Phaseolus vulgaris L.*) (Gamundi et al., 2002). En cambio, en otras leguminosas como alfalfa (*Medicago sativa*), lupino (*Lupinus polyphyllus*) y ciertas especies de tréboles, aunque es posible la reproducción, la población sólo se mantiene o crece levemente, sin causar daños. Ciertas malezas como la verdolaga (*Portulaca oleracea*), ortiga mansa (*Lamium amplexicaule*) y capiquí (*Stellaria media*) también actúan como hospedantes del SCN (Gamundi et al., 2002).

2.3 Prácticas de control

En los pasados años se han intentado varias estrategias de control las cuales no han sido efectivas del todo. Más aun, algunos nematicidas efectivos han sido prohibidos o restringidos por razones ambientales, de salud o viabilidad económica. La práctica más común es el uso de

variedades resistentes en rotación de cultivos para evitar el desarrollo de nuevas razas del nematodo (Schmitt, 1991).

2.3.1 Prácticas de control biológico

El uso de enmiendas que promueven la actividad quitinolítica están siendo evaluadas como opciones de manejo para el control de nematodos parásitos de plantas (Tian et al., 2000). La quitina es un polisacárido, compuesto en gran parte de N-acetil-D-glucosamina que se encuentra ampliamente en la naturaleza. Es además un constituyente importante en la pared del micelio de hongos, algas y el exoesqueleto de artrópodos (Muzzarelli, 1977). La quitina se encuentra también en la capa media de la cáscara de los huevos de los nematodos tylencoideos como *Meloidogyne javanica*, *Rotylenchulus reniformis*, *Tylenchulus semipenetrans* y *Pratylenchus minyus* (Bird y McClure, 1976) y en la capa externa de la cáscara de los huevos de *Heterodera schachtii* y *H. glycines* (Perry y Marcus, 1986). Las bacterias del género *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Serratia* se conocen por su habilidad en la producción de enzimas quitinolíticas (Nandakumar et al., 2007; Viswanathan y Samiyappan, 2001). En varios estudios realizados se ha evaluado la capacidad quitinolítica de estas bacterias para asociarlas a la actividad antagonista ante fitopatógenos (Nandakumar et al., 2007). La bacteria *Serratia marcescens* es conocida por su capacidad de producción de enzimas hidrolíticas, tales como quitinasas, proteasas, DNAasas, esterases y lipasas (Mosa et al., 2000). Esta especie tiene el mecanismo de infectar tejidos susceptibles del cuerpo de insectos destruyéndolos al ser alojada en el aparato digestivo. *Serratia marcescens* ha sido reportada como patógena de insectos y hongos, mayormente atribuida a la producción de quitinasas y proteasas (Mosa et al., 2000; Sikorowski y Lawrence, 1998). Estas enzimas juegan un rol importante en la penetración de la bacteria a la cutícula del

insecto degradando la misma y a su vez los tejidos internos (Bogo et al., 1998). Se menciona que hay una cepa de *S. marcescens* capaz de matar a larvas de *Helicoverpa zea* en un término de 2 a 3 días con una población de menos de 10 bacterias por insecto. Sin embargo esta bacteria puede ser dañina a la salud humana por lo cual no se recomienda su uso directo en el campo (Mosa et al., 2000).

El antibiótico 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG), producido por varias cepas de *Pseudomonas* spp., puede inhibir la actividad y/o el crecimiento de algunos hongos y oomicetos patógenos de plantas, como también el ataque de nematodos fitopatógenos (Timper et al., 2009). Las bacterias colonizadoras de la rizósfera de plantas, rizobacterias, han presentado actividad biocontroladora ante los nematodos. Entre los géneros de rizobacterias que se han reportado como microorganismos antagonistas de nematodos se mencionan los géneros: *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Desulfovibrio*, *Pseudomonas* y *Serratia*. Estas rizobacterias se han asociado a nematodos como: *Belonolaimus* sp., *Caenorhabditis* sp., *Criconemella* sp., *Globodera* sp., *Heterodera* sp., *Meloidogyne* sp., *Pratylenchus* sp., *Rotylenchulus* sp. y *Tylenchorhynchus* sp. (Siddiqui et al., 1999). De estas investigaciones la mayoría se ha centrado en el uso de rizobacterias para el control biológico de *M. incognita* y *H. schachtii*. En uno de los estudios sobre *H. glycines* Kloepper et al., (1992) encontraron que cepas de *Bacillus* y *Pseudomonas* reducen el número de quistes. Tian et al. mencionan estudios anteriores donde se han revelado ciertos mecanismos de acción antagonista por parte de las rizobacterias. Entre los ejemplos mencionan a cepas de *Pseudomonas* las cuales se le atribuye su capacidad nematicida a la producción de antibióticos como DAGP antes mencionado y la inducción de resistencia sistémica a la planta (Tian et al., 2007). Tian et al. también menciona en su publicación un trabajo de Mena et al. (2002) quienes reportan a *Corynebacterium paurometabolum*, inhibiendo

la eclosión de huevos de nematodos, gracias a la producción de quitinasa y sulfuro de hidrogeno. Las rizobacterias pueden interferir con el proceso de exudado de raíces, bloqueando las áreas receptoras en las raíces o modificando los exudados de tal manera que eviten la atracción de nematodos o la eclosión de huevos (Sikora et al., 1993). Se ha encontrado que las rizobacterias estimulan a la producción de compuestos bioquímicos para defenderse de los patógenos; entre estos compuestos mencionan la producción de quitinasas, actividad peroxidasa entre otros metabolitos secundarios. En adición, Oka y colaboradores en el 1993, encontraron relación entre la producción de amoniaco por parte de la rizobacteria *Bacillus cereus* al degradar proteína y la actividad nematocida detectada. Estudios continuos de Oka y Pivonia en 2002 confirmaron el uso de compuestos que ayudaban a la nitrificación en el suelo y enmiendas de amonio para el control del nematodo *Meloidogyne javanica*.

Varios estudios han comprobado la capacidad nematocida por parte de algunos hongos. Regaieg y colaboradores en el 2010 estudiaron el efecto de *Verticillium leptobactrum* en la viabilidad del nematodo *Meloidogyne incognita*, nematodo que tiene un ciclo de vida muy parecido al de *Heterodera glycines*. En las primeras etapas de la infección del hongo este produce una proteasa capaz de degradar la vitelina, compuesto presente en las membranas de huevos de diferentes especies de animales incluyendo a los nematodos. Esta capa protege al huevo al igual que la quitina, compuesto de las capas externas del caparazón.

Se ha comprobado que existen mecanismos naturales que son los responsables, en parte, de mantener un balance ecológico en el suelo. Basado en esta aseveración y en consciencia de eliminar productos químicos dañinos al ambiente, surge el interés de encontrar algún organismo capaz de controlar la infección del nematodo. En este trabajo nos enfocamos en las bacterias ya que por conocimiento previo éstas suelen compartir el ecosistema del suelo con las plantas y en

este caso los nematodos. Existen un gran número de especies que interactúan en el suelo. Ciertos géneros ya han sido reportados en la literatura (Tian et al., 2007) con capacidades controladoras. Son algunos de estos géneros los que intereso aislar para estudiar su potencial controlador y buscar la manera de aplicar técnicas al campo más efectivas y amigables con el ambiente.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Recolección de muestras de suelo para aislar bacterias

Se colectaron cinco muestras de suelo en predios infectados con el nematodo de quiste de la soya (SCN) en la finca de TARS en Isabela en marzo del año 2011. Se utilizó una pala de corte profundo para colectar cinco muestras de 100 g de suelo del área cercana a las raíces de plantas de soya, con apariencia saludable. El predio tenía un área de 100 x 50 pies cuadrados. Las muestras fueron transportadas en bolsas plásticas estériles en nevera para conservar la frescura. Luego en el laboratorio se procesaron las muestras para el aislamiento de bacterias.

3.1.1 Aislamiento

De cada muestra se escogieron 10 g de suelo y se colocaron en 90 ml de agua destilada estéril. De esta suspensión se seleccionó 1 ml y se realizaron 5 diluciones en serie en tubos de ensayo conteniendo 9 ml de agua destilada estéril. Con una micropipeta, se seleccionó una alícuota de 100 μ l de cada dilución y se colocó en placas Petri con TSA 5% (Tryptic Soy Agar/ Agar tripticasa de soya). Se utilizaron tres placas Petri por muestra. Luego de 24 hrs a 25°C se seleccionaron 20 bacterias al azar de la dilución 10^{-3} las cuales fueron transferidas en forma de estriado a placas de TSA por 24 hrs a 25°C. Este procedimiento se repitió hasta lograr colonias puras en cada bacteria seleccionada. Una vez lograda la purificación de las colonias, éstas fueron transferidas a platos con medio de cultivo *Pseudomonas* agar F, conocido también como medio King B. Este medio es utilizado para el aislamiento, la detección y la diferenciación

de especies de *Pseudomonas*, en base a la producción de fluoresceína (King et al., 1954). El tiempo de incubación fue de 24 hrs a 25-28°C, en aerobiosis. Luego de las 24 hrs se iluminaron con una lámpara de luz ultravioleta “Spectroline” modelo EN-180L con un largo de onda de 365 nm, para detectar su capacidad fluorescente. Cada bacteria positiva a la prueba de King B fue seleccionada y se le asignó un código para poderlas distinguir durante el experimento.

3.2 Criterios de selección de bacterias

Para la selección de las posibles bacterias controladoras se tomó en consideración la composición fisiológica del nematodo en su etapa de huevo y larva y el proceso de infección de la raíz de soya. Se realizaron pruebas de degradación de quitina y caseína. Una reacción positiva a la degradación de estos componentes significó una característica deseada en el antagonismo del nematodo. Además, la producción de pigmento fluorescente bajo luz ultravioleta por la bacteria se consideró otro criterio deseable ya que estudios realizados mencionan a ciertas especies de *Pseudomonas* fluorescentes con actividad inhibidora sobre patógenos a plantas. Por último, se evaluó el efecto de las bacterias sobre el crecimiento de las plantas de soya.

3.2.1 Actividad quitinolítica

Las bacterias se crecieron en medio de quitina coloidal (Khan et al., 2010) para detectar capacidad de actividad quitinolítica, utilizando como criterio un halo transparente alrededor de la colonia. La preparación del medio de quitina consistió en la utilización de hojuelas de quitina provenientes de crustáceos. Para preparar la solución coloidal se utilizaron 40 g de hojuelas de quitina y se trituraron en una licuadora. Luego se colocó el licuado en un frasco de 1000 ml y se El producto de quitina fue obtenido de la compañía Sigma-Aldrich®.

le añadieron 400 ml de HCl concentrado. La mezcla se colocó sobre un agitador magnético y se agitó por 30 a 50 minutos, hasta lograr que la quitina se disolviera. La suspensión de HCl y quitina se transfirió a un envase más grande y se le añadieron 2 litros de agua potable fría a una temperatura de 5-10°C para crear un precipitado. Luego de formado el precipitado éste se filtró por succión utilizando un aspirador y se colectó en un frasco de 2L de capacidad y se lavó varias veces con agua potable hasta subir el pH a 3.5. La suspensión se pasó por autoclave a 15 lb de presión a 121°C por 15 minutos y se almacenó a temperatura ambiente (Hsu y Lockwood, 1975).

Para conocer la concentración de quitina se secó una muestra de 5 ml de la solución coloidal, en un horno a 100°C por 48 hr. Una vez deshidratada la muestra se pesó y se estableció una ecuación de concentración de cantidad de quitina seca por ml de solución coloidal. Luego de conocer la concentración de la solución de quitina coloidal se procedió a preparar el medio. Este consistió de 6.0 g de Na₂HPO₄, 3.0 g de KH₂PO₄, 1.0 g de NH₄Cl, 0.5 g de NaCl, 0.05 g de extracto de levadura, 1% (peso/volumen) de quitina coloidal, 15.0 g de agar y 1L de agua destilada des-ionizada, esto ajustado a un pH de 7± 0.02 con NaOH, (Kamil, 2007). Las placas se incubaron a 25°C, por varios días hasta observar la degradación de quitina.

3.2.2 Degradación de proteasas

Las bacterias que presentaron capacidad fluorescente y degradación de quitina fueron seleccionadas y aisladas individualmente en placas Petri con “M9 Minimal Medium”, con una capa superior de azo-caseína, medio utilizado para determinar la capacidad de degradación de proteínas. El producto se preparó siguiendo las instrucciones de la etiqueta. Luego de 24 hrs de incubación se procedió a observar las bacterias que habían degradado la caseína creando halos

El medio M9 y azo-caseína se obtuvieron de la compañía Sigma-Aldrich®.

transparentes en el medio.

3.2.3 Curva de crecimiento bacteriano

Se realizaron curvas de crecimiento a las dos bacterias que cumplieron con todos los requisitos para corroborar el tiempo necesario en que las bacterias llegaran a la fase de crecimiento logarítmica necesaria para la infección. Los caldos de bacteria se crecieron en matraces Erlenmeyer con 45 ml de “Luria Broth” (LB). Se utilizaron tres matraces por bacteria. Éstos fueron colocados en un agitador (Orbit Environ Shaker 3527, Lab-line Instruments, Inc.) a temperatura ambiente (aproximadamente 30°C). Por 24 horas se tomaron medidas de absorbancia cada 30 minutos a un largo de onda de 600 nm utilizando un espectrofotómetro (Modelo Thermo Scientific GS10- UV- VIS). Los datos fueron almacenados y analizados en el programa Excel de Microsoft.

3.3 Identificación molecular

3.3.1 Extracción de ADN

Luego de los análisis realizados con las pruebas anteriores de degradación de medio en quitina y caseína respectivamente, se procedió a un análisis genético de las dos bacterias que cumplieron con todos los requisitos (B6 y B10). Para este análisis se realizó una extracción del ADN utilizando colonias puras de los respectivos cultivos, tomadas con un palillo de madera estéril disueltas en un tubo Eppendorf con 100 µl de agua destilada estéril. Luego se colocó el

tubo en un termociclador (Modelo Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400) a 99.9°C por once minutos. Luego se centrifugó en una micro-centrífuga (Modelo Eppendorf 5415D) por cinco minutos a 13.2 rpm. Se extrajo el sobrenadante (donde se encuentra el ADN) con una micro-pipeta y se almacenó en un tubo Eppendorf estéril a 4°C (Grobkopf et al., 1998).

3.3.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La identificación de las cepas bacterianas comenzó como protocolo con una corrida en gel de agarosa mostrada en la figura 3 con los productos de PCR de cada bacteria aislada. Estos productos fueron luego utilizados para la digestión enzimática con la enzima cortadora SAU 3A mostrada en la figura 4, la cual permite detectar en base a diferencias en tamaños de bandas, cepas diferentes entre sí.

La reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase chain reaction: PCR) se realizó utilizando el ADN total genómico extraído de cada bacteria. Se utilizaron los iniciadores BSF-8 (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') y EU 1449 R (5'-TGA CTG ACT GAG GCT ACC TTG TTA CGA CTT-3') adquiridos de Integrated DNA Technologies, Inc. El volumen total de la reacción de PRC fue de 50 µl, conteniendo: 5µl de ADN, 5 µl de buffer (NH₄SO₄), 3 µl de MgCl₂, 1 µl de cada iniciador (BSF-8 y EU 1449), 1 µl de “dNTP” y 33 µl de agua destilada estéril. Para la amplificación del ADN se utilizó el termociclador (Modelo Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400). Los ciclos y tiempos de amplificación utilizados fueron: un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C por un minuto, donde luego se le añadió 1 µl de la polimerasa Taq, 30 ciclos a 94°C por 45 segundos (desnaturalización), 50°C por 30 segundos (hibridación) y 72°C por dos minutos (extensión), seguido de un ciclo final de extensión a 72°C por siete minutos

y 4°C infinito.

Los productos de amplificación del PCR fueron visualizados en una gel de agarosa al 0.8%, teñido con bromuro de etidio. Se realizó una electroforesis a 80V durante 40 minutos, utilizando el amortiguador TAE 50x. Para la observación de bandas en el gel, se utilizó un visualizador de rayos ultravioleta (Modelo Transilluminator FBT 1-88 Fisher Biotech by Fisher Scientific). El tamaño de las bandas fue comparado con la escalera (Quick-Load® 1 kb DNA Ladder).

Una vez obtenidos los productos del PCR, se realizó una limpieza de cada banda utilizando QIAquick® PCR Purification Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego con los productos limpios se realizó una digestión enzimática con la enzima SAU 3A. Esta reacción de digestión enzimática utilizando a SAU 3A como enzima de restricción, se utiliza para generar polimorfismos (“RFLP” siglas en inglés) en el tamaño de los fragmentos y de esta manera se ven diferencias entre géneros de organismos (NCBI 2014). Para la reacción de digestión se prepararon tubitos individuales con los siguientes ingredientes a un volumen final de 25 µl: 20 µl de PCR limpio, 2.5 µl de buffer 10x, .6 µl de SAU 3A y 2 µL de BSA. Luego se incubó a 37°C por 2 hrs. Luego los productos fueron estudiados y comparados en un gel de agarosa antes descrita.

3.3.3 Clonación y secuenciación

Se realizó un PCR con los iniciadores BSR 534 (5'-ATT-ACC-GCG-GCT-GCT-GGC-3') y BSF8 (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'). El volumen total de la reacción de

PRC fue de 50 µl, conteniendo: 5 µl de ADN, 5 µl de Buffer (NH₄SO₄), 3 µl de MgCl₂, 1 µl de cada iniciador (BSF-8 y BSR 534), 1 µl de “dNTP” y 33 µl de agua destilada estéril. Para la amplificación del ADN se utilizó el termociclador (Modelo Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400). Los ciclos y tiempos de amplificación utilizados fueron: un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C por tres minutos, donde luego se le añadió 1µl de la Polimerasa Taq, 30 ciclos a 95°C por 30 segundos (desnaturalización), 53.5°C por 30 segundos (hibridación) y 72°C por 45 segundos (extensión), seguido de un ciclo final de extensión a 72°C por siete minutos y 4°C por tiempo indefinido.

Los productos de PCR descritos anteriormente fueron clonados en el vector PGEMT-Easy® (Promega Corporation, Milwaukee, WI). Los plásmidos fueron extraídos utilizando Qiagen® Mini prep, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los insertos fueron secuenciados utilizando los iniciadores universales M13Fwd 5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3' y M13 REV 5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC-3' con la secuenciadora (ABI PRISM® BigDye™ Terminators) y analizados con el programa (ABI 310 Genetic Analyzer) (Applied Biosystems, CA,USA).

3.4 Extracción de Nematodos

Los NQS fueron extraídos de suelo infectado con el parásito y cultivados con soya en la finca de TARS en Isabela, PR. Se recolectaron muestras siguiendo un patrón sistemático de zig-zag cada 3 pies, tomando en cuenta la distribución en parchos del NQS. Las muestras se tomaron a una profundidad de 6 a 10 pulgadas cerca de la raíz de la planta. Se colectaron alrededor de 250 cc de suelo y se colocaron en bolsas plásticas. Luego se transportaron en refrigeración al

laboratorio para su procesamiento. Una vez en el laboratorio las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente por aproximadamente 24 hrs, tomando en cuenta la humedad del suelo. Luego se procesaron utilizando el método de Fernwick modificado. Las modificaciones incluyen el uso de un balde en el cual los 250 cc de suelo en un balde y añadir 3 litros de agua potable. Luego se batió la suspensión por medio minuto con un agitador ajustado a un taladro. Luego se decantó la suspensión pasándola por los tamices #20 y #60, ensamblados según el orden. La muestra con quistes fue colectada en el tamiz #60 la cual se transfirió a una placa Petri. Una vez en la placa Petri, bajo un estereoscopio (Modelo Olympus SZ-60) se limpió la muestra, extrayendo los quistes enteros con una pipeta o con pinzas sin romperlos. Estos quistes fueron colectados en viales con agua destilada y colocados en nevera a 4°C para su preservación.

Para la desinfección de los quistes se utilizó la técnica descrita por Atena Shedmehr y colaboradores en el 2007; los quistes se sumergieron en etanol al 70% por 1 min luego en hipoclorito de sodio al 5% con 0.05% de Triton x-100 por 5 min. Luego se le agregó hipoclorito de sodio al 1% por 20 minutos. Finalmente, se enjuagaron varias veces con agua destilada y fueron almacenados en nevera a 4°C.

Para la extracción de larvas de NQS, se utilizó el embudo Baermann. La técnica consistió en colocar los quistes sobre papel "Kimwype" adherido a la rejilla colocada sobre el embudo, en contacto con una solución estéril de 4 mM ZnCl₂. Al cabo de 7 días se colectaron larvas viables en etapa juvenil J2. Las pruebas de inoculación se realizaron el mismo día que se colectaron las larvas.

3.5 Evaluación de posibles agentes biocontroladores ante la infección *H. glycines* en raíces de soya

3.5.1 Ensayo de invernadero

Para determinar la actividad controladora de la bacteria sobre el nematodo SCN en interacción con la planta de soya se realizaron pruebas en invernadero con cinco repeticiones para cada tratamiento. Para este estudio se utilizó suelo de Isabela del mismo lugar donde se extrajeron los nematodos. Antes de establecer el ensayo, se realizó una pasteurización del suelo para reducir otros microorganismos o contaminantes. La pasteurización se realizó en autoclave durante dos ciclos de 1 hora cada uno a 121 °C y 15 lb de presión.

Las semillas de soya cultivar 'Lee 74' obtenidas de la EEA de Isabela, PR., fueron desinfectadas utilizando la técnica mencionada en Shadmehr y colaboradores (2007), con algunas modificaciones. Las semillas se colocaron en un saquito de gaza estéril, el cual fue sumergido en etanol 70% por 1 minuto, luego se transfirió a una solución de hipoclorito de sodio al 20% con varias gotas de Tween 20 por 15 minutos. Finalmente se enjuagó en tres frascos conteniendo agua destilada estéril. Luego, las semillas se colocaron sobre papel secante. Se colocó suelo previamente pasteurizado en 30 tiestos previamente desinfectados, de 4 pulgadas de diámetro. Luego, se sembró una semilla de soya en cada tiesto. Al cabo de 14 días, se procedió a la aplicación de tratamientos. Las plantulitas de soya se trataron con: Bacteria B6 sola, Bacteria B10 sola; Bacteria B6 más larvas del nematodo; Bacteria B10 más larvas del nematodo; y el nematodo solo. Como control absoluto se sembró soya en cinco tiestos libres de bacterias y nematodos.

3.5.2 Preparación de los inóculos de bacteria

Para los ensayos de antagonismo, se cultivaron de forma individual las bacterias B10 y B6 en 250 ml de caldo nutritivo Luria (LB) a un pH de ± 7.02 . Este cultivo se utilizó como inóculo de las bacterias. La concentración inicial del inóculo correspondiente a la bacteria B6 se seleccionó de una fase de crecimiento a una densidad óptica de 0.849 a 660 nm, mientras que la concentración correspondiente a la bacteria B10 se seleccionó a 0.471 a 660 nm. Luego de determinar cada inóculo bacterial, éste se transfirió en 10 tubos de 50 ml de capacidad, 25 ml de cultivo, cantidad que luego se añadió a los tiestos correspondientes con el tratamiento de cada bacteria. Como resultado tuvimos un total de 10 tiestos con 25 ml de cultivo bacteriano B6 cada uno y 10 tiestos con 25ml de cultivo bacteriano B10 cada uno. Posteriormente, a cinco tiestos de cada grupo se infectarán con nematodos.

3.5.2 Preparación de los inóculos de larvas de NQS

Para los tratamientos con nematodos se utilizó la técnica del embudo de Baermann antes mencionada en la extracción de nematodo; se prepararon 15 alícuotas con aproximadamente 500 larvas de *H. glycines* vivas y en movimiento, suspendidas en 4 ml de agua destilada estéril. Cada alícuota se colocó en cinco tiestos previamente infectados con las bacteria B10 y otros cinco tiestos infectados con B6. En adición, se infectaron cinco tiestos libres de bacterias; en total quince tiestos fueron inoculados con larvas de *H. glycines*. El inóculo del nematodo fue añadido

a los tiestos luego de perforar levemente el suelo cerca de la raíz de la planta para permitir un mejor proceso de infección.

3.5.3 Datos recolectados

Al cabo de quince días se tomaron datos de: peso fresco del follaje, peso fresco de la raíz, altura de la planta e incidencia de infección de nematodos en la raíz. Este último dato se realizó teñiendo la raíz, utilizando el método con Fucsina acida- Hipoclorito de sodio (Ravichandra, 2010). Para observar las raíces teñidas se utilizó un microscopio (Modelo Axiostar Plus - Zeiss).

3.6 Bioensayo de antagonismo: Efecto de las bacterias a huevos y larvas de *H. glycines*

Se preparó 200 mL del medio mínimo de cultivo M-9 sin fuente de carbono (glucosa) para observar la interacción directa de las bacterias con huevos y larvas de *H. glycines* (Apéndice 3). Los huevos y larvas fueron obtenidos de quistes previamente desinfectados con la técnica antes mencionada. Se prepararon cinco micro cajas estériles con seis fosas individuales, a cada fosa se le añadió 5 ml de medio mínimo M-9. Se utilizaron dos micro-cajas para cada bacteria (B6 y B10). A una de las cajas, de cada bacteria, se le añadió el contenido de huevos y larvas provenientes de un quiste y a la segunda caja se le colocó un quiste entero. A cada fosa, se le añadió 500 µl de solución bacteriana según el tratamiento. Una de las micro cajas se usó como control; en tres fosas se colocaron dos quistes por fosa y en las otras tres se colocó el contenido de larvas y huevos de NQS. Diariamente se realizaban observaciones y se tomaron fotos bajo el estereoscopio y el microscopio para recopilar datos de la actividad ocurrida con estos organismos. Al cabo de 5 días de incubación se observaron la condición de las larvas de los

distintos tratamientos incluyendo al control y se le aplicó una gota de NaOH 1N (Chen y Dickson, 2000), para comprobar la movilidad de las mismas.

4. RESULTADOS

4.1 Muestreo y Aislamiento de bacterias

De las cinco muestras de suelo se seleccionaron al azar 12 colonias de bacteria en la dilución 10^{-3} . Al re-aislarlas en TSA, las colonias aparentaban ser diferentes morfológicamente. Una de las colonias presentaba una coloración rojo intenso y un crecimiento agresivo en las placas de aislamiento. Las características observadas de esta colonia concordaban con la descripción de algunas especies del género *Serratia*, la cual ha sido reportada como una bacteria con actividad antagonista (Perry y Marcus, 1986). Las restantes colonias presentaban un color crema blausco.

4.2 Criterios de evaluación a bacterias

En la tabla 1, se muestra el resultado de la producción de fluorescencia luego de realizada la prueba King B. De las 12 colonias examinadas, 11 presentaron fluorescencia según la prueba. La única bacteria que no emitió fluorescencia fue aquella que su colonia presentaba un color rojo intenso. A ésta bacteria se le nombró como B6. En la figura 1, se puede apreciar la producción de fluorescencia de las bacterias B3 y B4 bajo luz ultravioleta.

En las pruebas de degradación de quitina y caseína, cinco cepas (B3, B7, B10, B12, B6) resultaron positivas a esta prueba. Aparentemente, estas bacterias tienen la distinción de producir quitinasas y proteasas. En la figura 2, se muestra las bacterias B6 y B10 creciendo en el medio indicativo de producción de quitinasa. Los halos transparentes alrededor de las colonias, significa que hubo producción de quitinasa.

Tabla 1. Pruebas a bacterias aisladas para comprobar criterios de evaluación

Bacterias	Medio King B Producción de Fluorescencia	Medio de Quitina Degradación del medio	Medio M9-minimal medium/Azo - casein Degradación del medio
B1	+	-	-
B2 a	+	-	+
B2 b	+	-	+
B3 a	+	+	+
B3 b	+	+	+
B4	+	-	+
B5	+	-	+
B6	-	+	+
B7	+	+	+
B8	+	-	-
B9	+	-	-
B10	+	+	+
B11 a	+	+	+
B11 b	+	+	+
B12	+	+	+



Figura 1. Producción de fluorescencia en medio King B. (A) Bacteria B4, (B) Bacteria B3, (C) Bacteria B6 no produjo fluorescencia

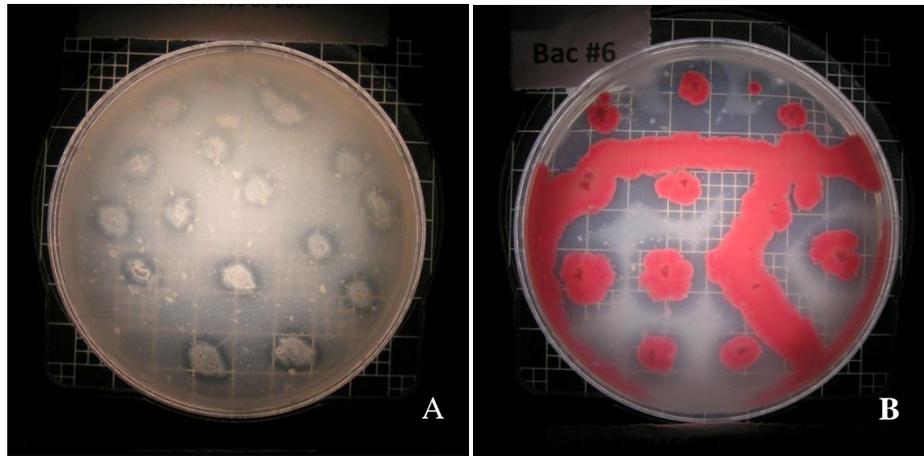


Figura 2. Halos de degradación en medio de Quitina. (A) Bacteria 10, (B) Bacteria 6

4.2 Identificación molecular

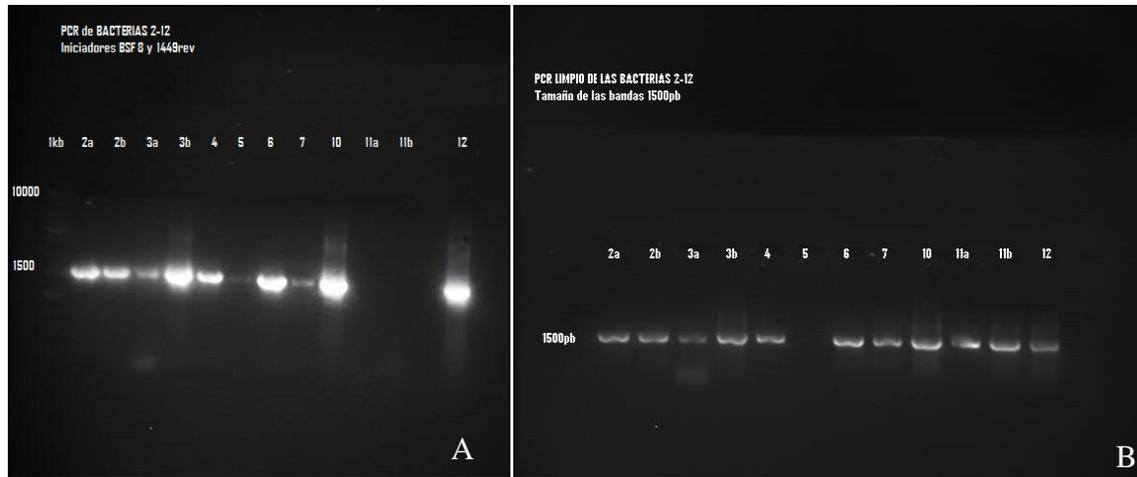


Figura 3. Gel de agarosa para la identificación y diferenciación de cepas bacterianas aisladas. (A) PCR de bacterias 2-12 con iniciadores BSF8 Y 1449REV. (B) PCR limpio de bacterias 2-12 muestran bandas limpias de 1500pb cada una.

De acuerdo a los resultados de la digestión enzimática con la enzima Sau 3A, se pudo detectar en la muestra una mayor población de bacterias de la misma especie en el suelo al presentar el mismo patrón de bandas luego de ser cortadas con la enzima (figura 4). En el gel de agarosa vemos que las columnas codificadas como 2a y 2b representan dos cepas similares con bandas del mismo tamaño. Las columnas 3a, 3b, 7, 10, 11a, 11b y 12 son cepas que coinciden en el mismo patrón de tamaño de bandas lo cual corresponden a una misma bacteria. La columna 4 representa un tamaño diferente al de las demás, al igual que la columna 6, lo cual pudiera interpretarse como cepas de bacterias diferentes. Con lo observado anteriormente podemos inferir que las bacterias evaluadas pertenecen a cuatro tipos de bacterias diferentes.

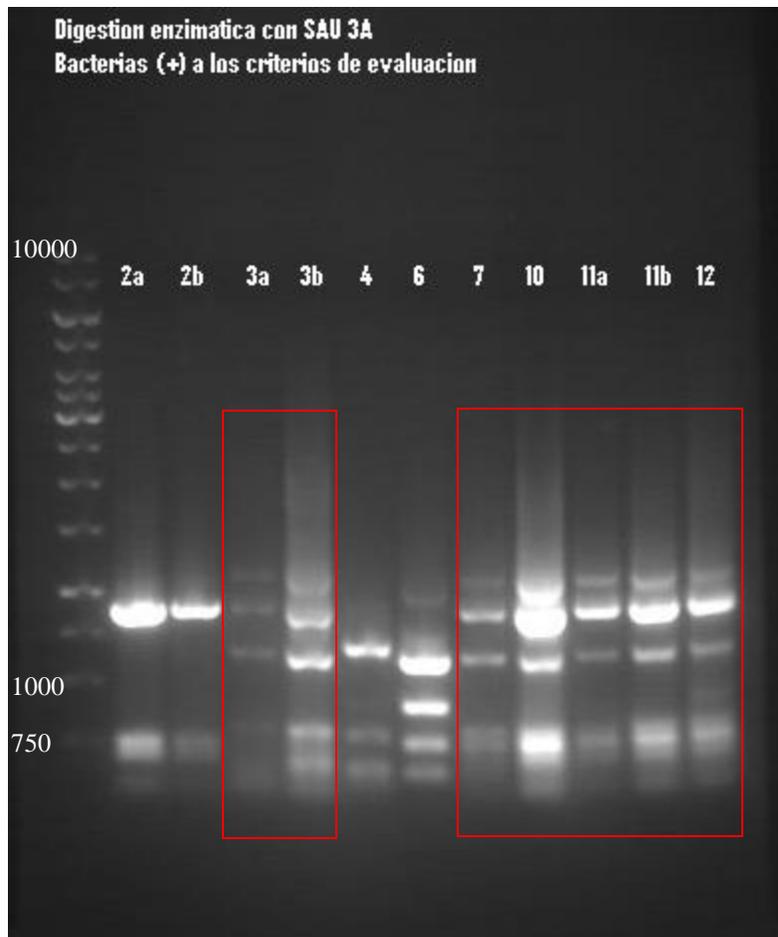


Figura 4. Gel de agarosa para la determinación de diferencias entre bacterias haciendo una digestión enzimática con Sau 3A. Cepas con el mismo patrón de bandas (recuadros rojos) representan el mismo organismo.

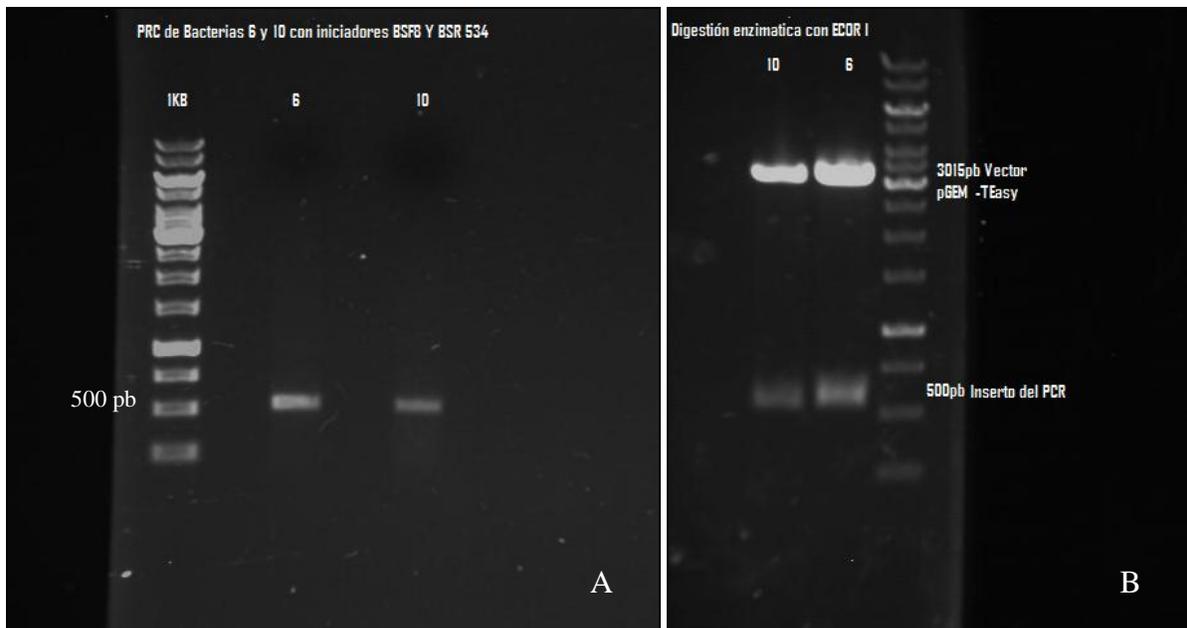


Figura 5. Gel de agarosa para corroborar el inserto del producto del PCR en el vector pGEM® - T Easy. (A) PCR de las bacterias 6 y 10 con los iniciadores BSF8 Y BSR 534, amplificando una banda de 500pb. (B) Digestión enzimática con ECOR I luego de ligación con el vector pGEM® - T Easy.

Luego de corroborar las cepas bacterianas aisladas con los criterios de evaluación (prueba King B, degradación de quitina, caseína y la digestión enzimática) se concluyó que de las 12 bacterias, dos de ellas (B6 y B10) correspondían a diferente género y presentaban características deseables para ser evaluados como posibles agentes de biocontrol sobre el nematodo de quiste de la soya.

4.2.1 Caracterización molecular de las bacterias B6 y B10

De acuerdo a la prueba de clonación en el vector pGEM® y el análisis de la secuencia de la región 16S del ADN ribosomal de la B6 y al compararla con las secuencias encontradas en el “GenBank bacterial sequences”, a través de BLASTN, se observó un porcentaje de similitud de

96% con la especie *Serratia marcescens* (Apéndice 1). De igual forma al comparar la secuencia de la región 16S del ADN ribosomal de la B10 a través de BLASTN, se observó un porcentaje de similitud de 100% con la cepa *Pseudomonas* sp. NJ-22 (Apéndice 1). Sin embargo, no fue posible una identificación de especie con esta prueba, por lo que se requiere de pruebas adicionales para conocer la especie.

4.3 Curvas de crecimiento bacteriano

Para los tratamientos de inoculación de bacterias fue necesario conocer el estado de crecimiento de la bacteria a utilizar, ya que de esta manera se conocería el momento óptimo para cosechar e inocular la misma. A continuación en la tabla 2, se muestran las lecturas de absorbancia tomadas para realizar la curva de crecimiento de nuestras dos bacterias.

Tabla 2. Medidas de absorbancia para *Serratia marcescens* y *Pseudomonas* sp. NJ-22

Tiempo (hrs)	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. NJ-22.
0	0.002	0.01
1	0.006	0.015
2	0.055	0.034
3	0.339	0.04
4	0.878	0.06
5	1.21	0.08
6	2.04	0.266
7	2.14	0.238
8	2.33	0.368
9	2.28	0.598
10	2.42	0.858
11	2.65	1.014
12	2.5	1.65
13	2.59	1.63
12	2.31	1.8
15	2.6	2.34
16	2.46	2.05
17	1.9	1.5
18	3.17	2.26
19	3.05	2.17
20	2.28	2.46
28	4.26	3.38
29	4.21	3.45
30	2.56	1.91

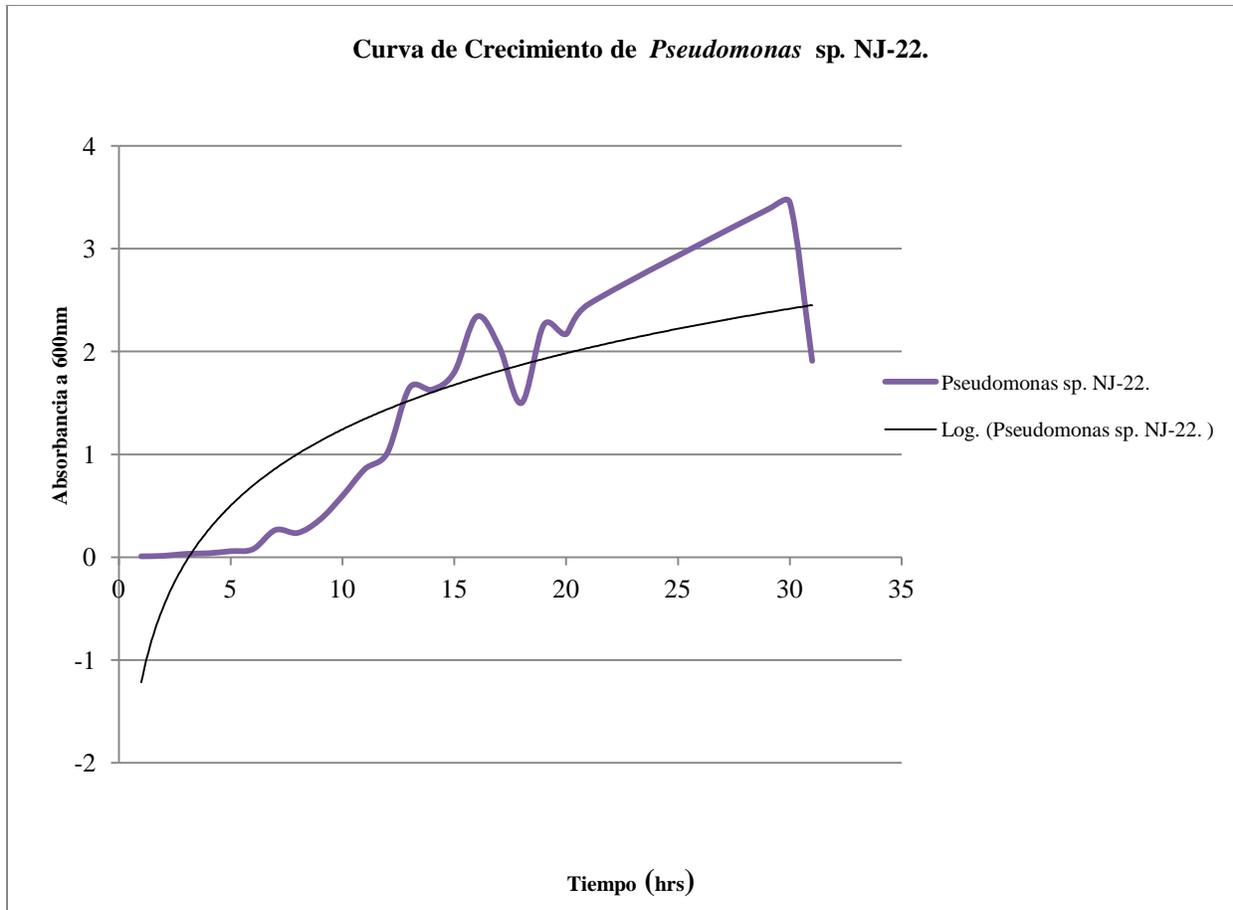


Figura 6. Curva de crecimiento de *Pseudomonas* sp. NJ-22.

En la curva de crecimiento para la bacteria del género *Pseudomonas* sp. NJ-22., mostrada en la figura 6 se observa una curva un poco variable en sus valores pero se pueden apreciar las fases de crecimiento. Esta presenta una fase lag de 9 horas, seguido de una etapa exponencial que dura aproximadamente 11 horas y una fase estacionaria de 10 horas. Tomando en cuenta esta información se pudo determinar el tiempo favorable para la cosecha del inóculo bacteriano de aproximadamente 18 horas.

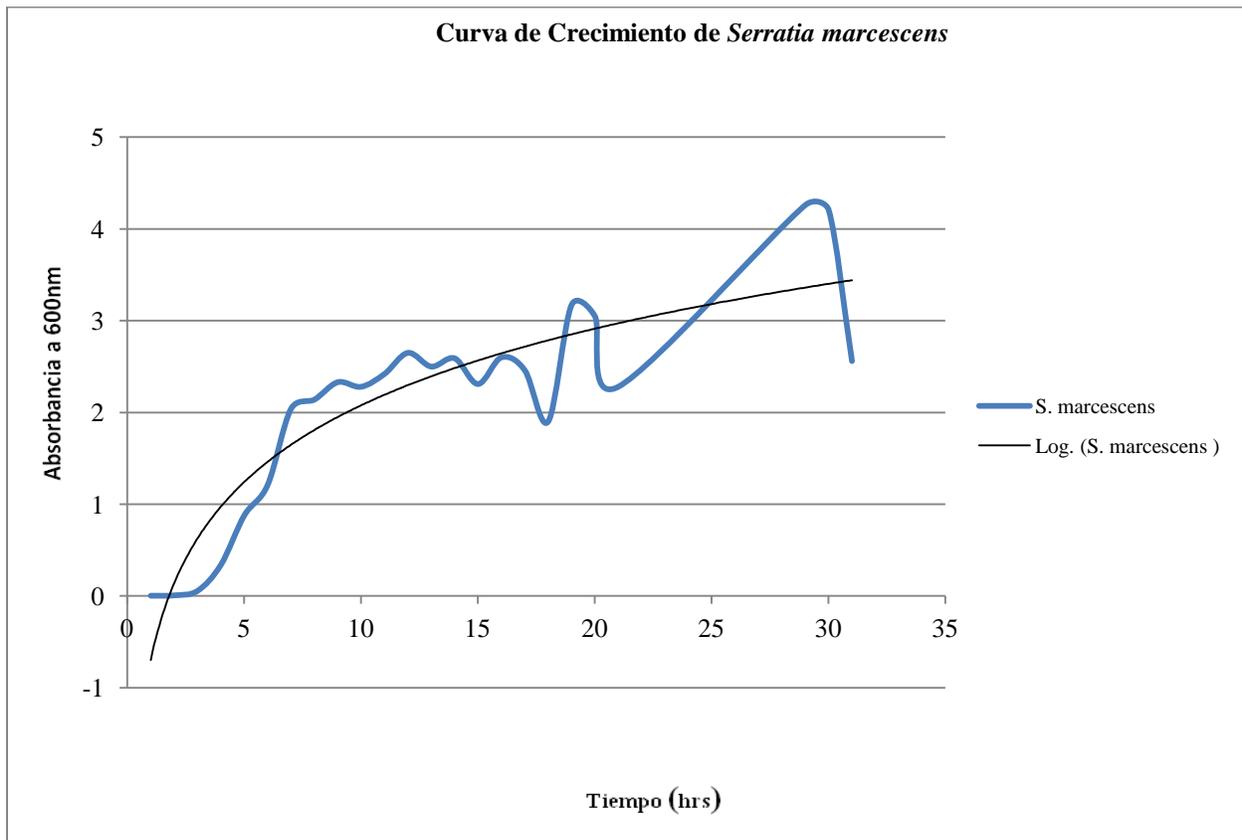


Figura 7. Curva de Crecimiento para *Serratia marcescens*.

En la curva de crecimiento para *Serratia marcescens* mostrada en la figura 7 se observa una curva con valores similares a la de *Pseudomonas* sp. NJ-22. En esta curva podemos ver una fase lag de 5 horas, seguido por la etapa exponencial de aproximadamente 15 horas y una fase estacionaria de 10 horas aproximadamente. De acuerdo a estos datos, el tiempo óptimo de su cosecha para el inóculo es de aproximadamente 20 horas.

4.4 Extracción de nematodos

Se extrajeron un total aproximado de 50 quistes (figura 8 A) de los que se logró obtener más de 1000 larvas juveniles J2 viables (figura 8 B). Las larvas presentaban un movimiento pausado y su morfología se distinguía por la presencia de un estilete de tamaño notable. No se observaron huevos ya que estos quedaron atrapados en el papel Kimwipe en la boca del embudo.

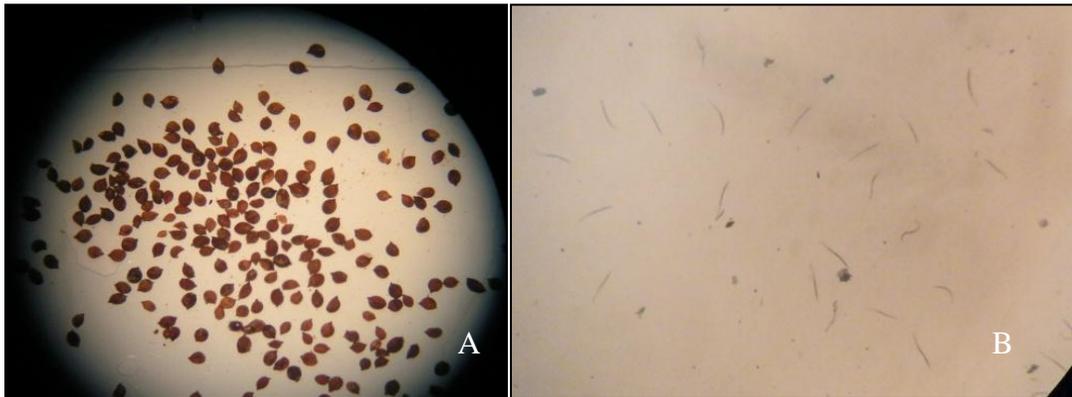


Figura 8. Extracción de nematodos. (A) Muestra limpia de quistes. (B) Muestra de larvas luego de eclosión por inducción del $ZnCl_2$.

4.5 Evaluación de la capacidad controladora de las bacterias (B10) y (B6) ante la infección de larvas J2 de *Heterodera glycines* en plantas de soya.

4.5.1 Efecto de los tratamientos en el peso de las raíces y en el peso fresco de las plantas

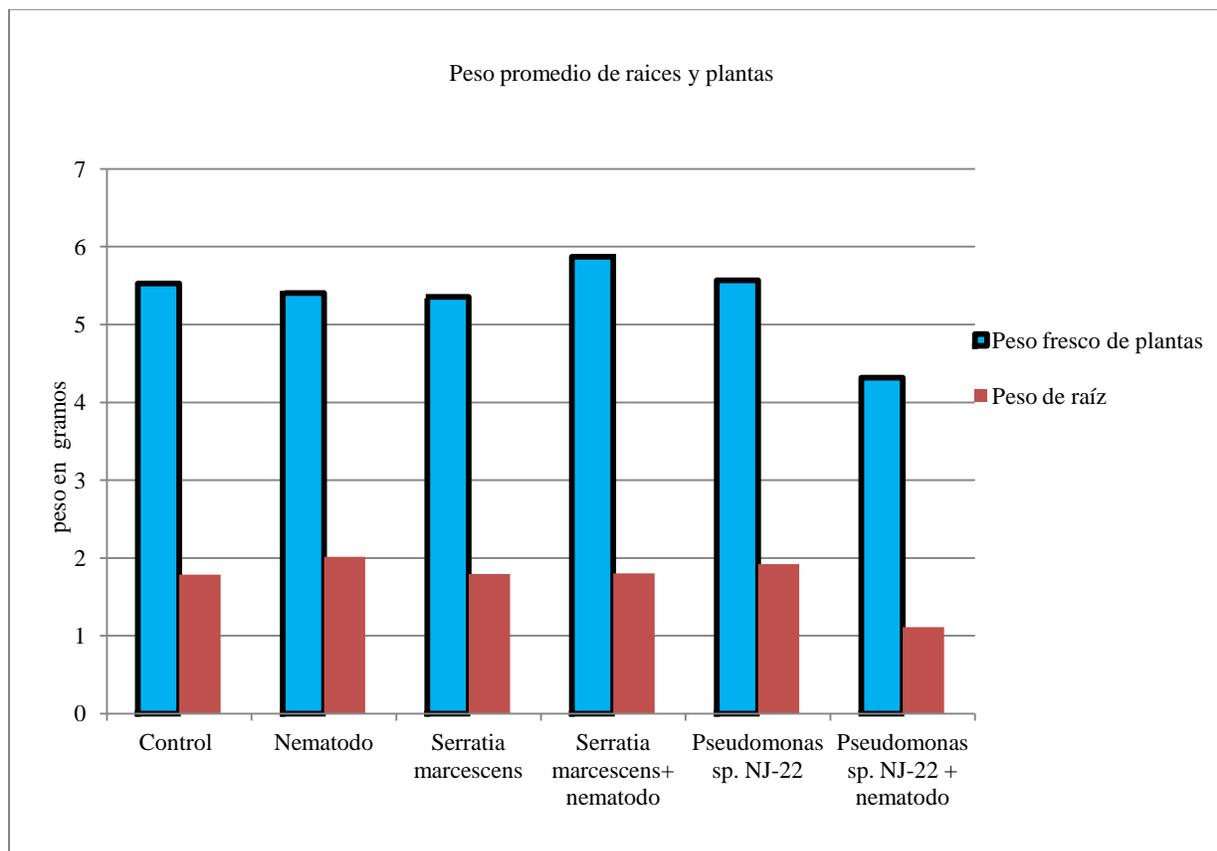


Figura 9. Efecto de los tratamientos en el peso de la raíz y peso fresco de las plantas. Según un análisis de varianza no hubo diferencia significativa entre los pesos de raíces de los tratamientos.

El efecto de los tratamientos en el peso fresco de plantas de soya lo podemos apreciar en la figura 9. Se realizó un análisis de varianza con $\alpha=.05$ en el cual se obtuvo un valor de $p=.77$, lo cual indica que no hay diferencias significativas entre los datos (Apéndice 2).

4.5.2 Efecto de los tratamientos en la altura de las plantas de soya

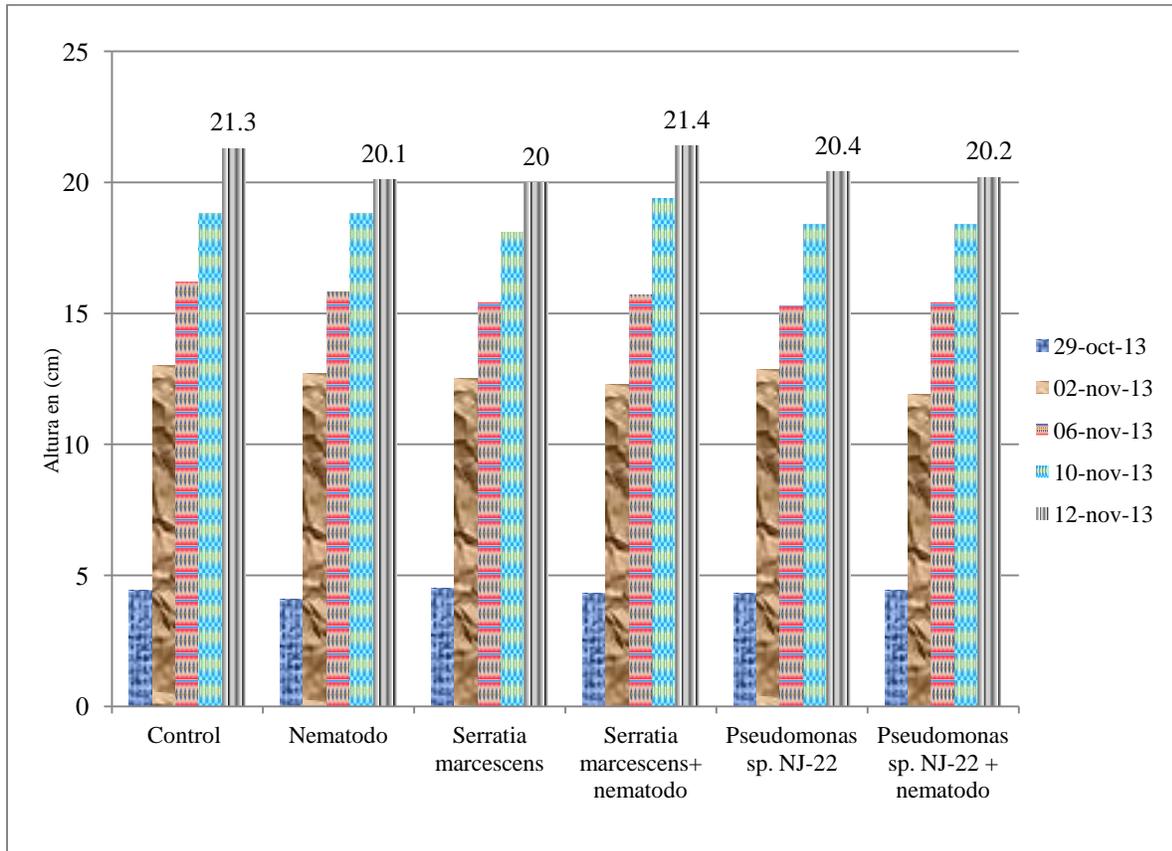


Figura 10. Efecto de los tratamientos en la altura de las plantas de soya.

En la figura 10 se puede apreciar el efecto de los tratamientos sobre la altura de plantas de soya a los 15 días. Podemos observar poca variabilidad de altura entre tratamientos lo que significa que ningún tratamiento se diferenció del control. Se realizó un análisis de varianzas (ANOVA) y no encontramos diferencias significativas entre los datos de altura.

4.5.3 Efecto de tratamientos en el desarrollo visible de las plantas

El crecimiento de las plantas de soya tratadas con las bacterias fue muy similar al control, posiblemente debido a que 15 días es muy poco tiempo para que los síntomas del nematodo se manifiesten. De igual forma según los datos anteriores de peso y altura no se encontró diferencia significativa en ambos análisis.

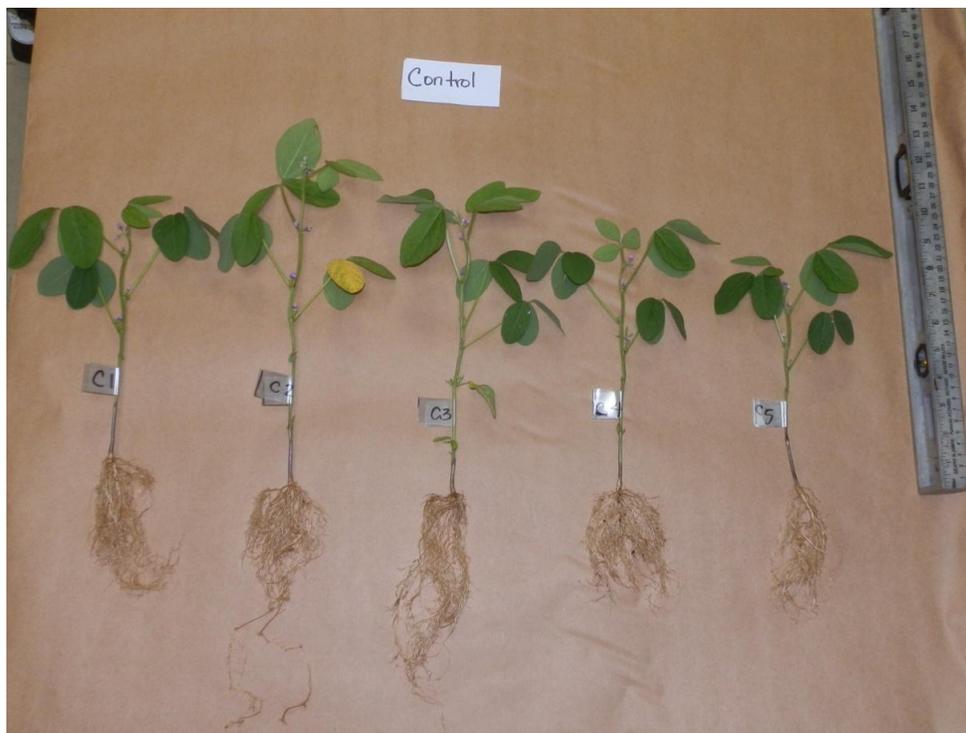
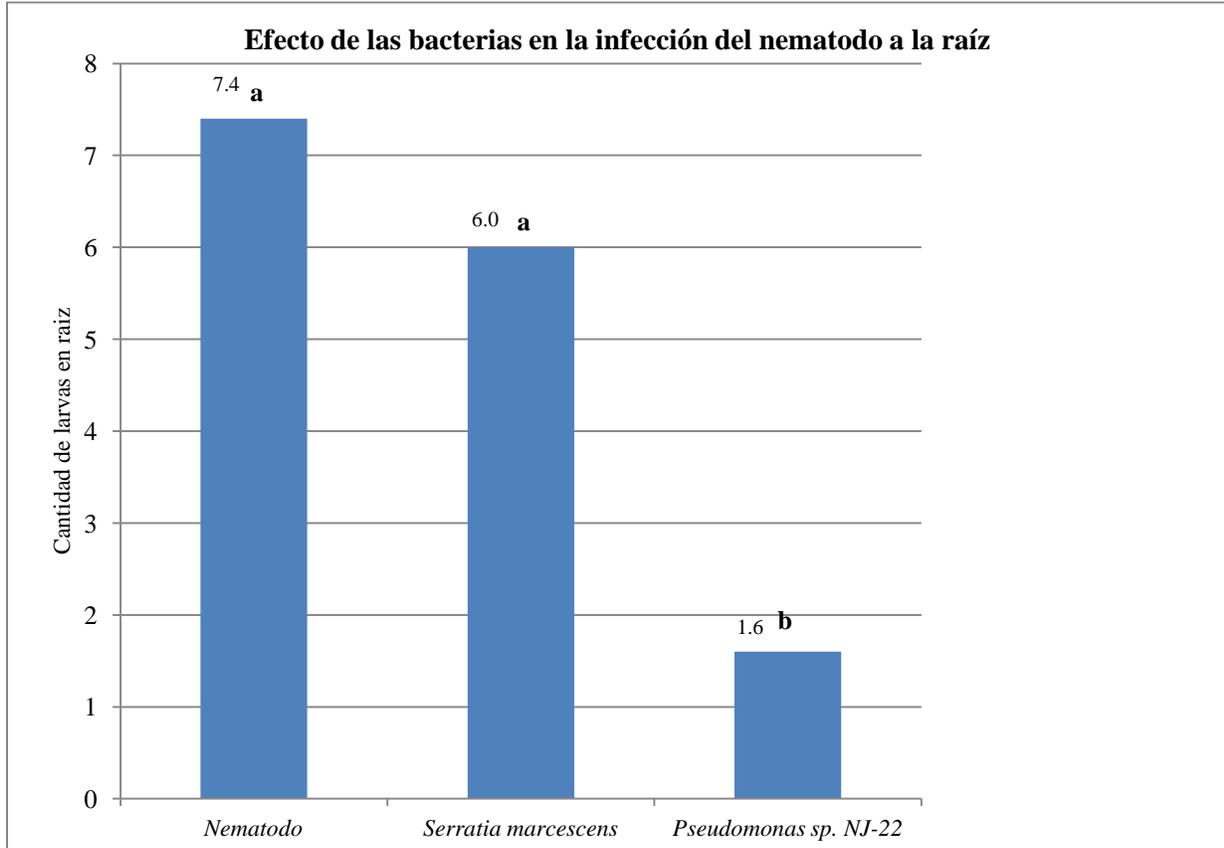


Figura 11. Tratamiento control en plantas de soya.

4.5.4 Efecto de los tratamientos en la infección de larvas a raíces con el método de tinción

Tabla 3. Resultado de análisis LSD al nivel de infección de larvas de *H. glycines* a raíces con tratamientos de bacteria.



$LSD = 2.587$

Figura 12. Efecto de las bacterias en la infección del nematodo a la raíz de soya. Cada valor es el producto de cinco replicaciones (plantas) por tratamiento. Nematodo (larvas de *Heterodera glycines*) como control. La bacteria *Serratia marcescens*; la bacteria *Pseudomonas sp. NJ-22*. Los datos promedio con la misma letra no difieren significativamente entre sí, según la prueba LSD ($\alpha = 0.5$).

Los resultados muestran que la bacteria *Pseudomonas sp. NJ-22* disminuyó significativamente el nivel de infección de larvas de *H. glycines* (Figura 12) en comparación con

los otros tratamientos (tabla 3). Sin embargo, plantas tratadas con la bacteria *Serratia marcescens* se comportaron igual al tratamiento de nematodos (control negativo).

4.5.5.1 Tinción de raíces: tratamiento control

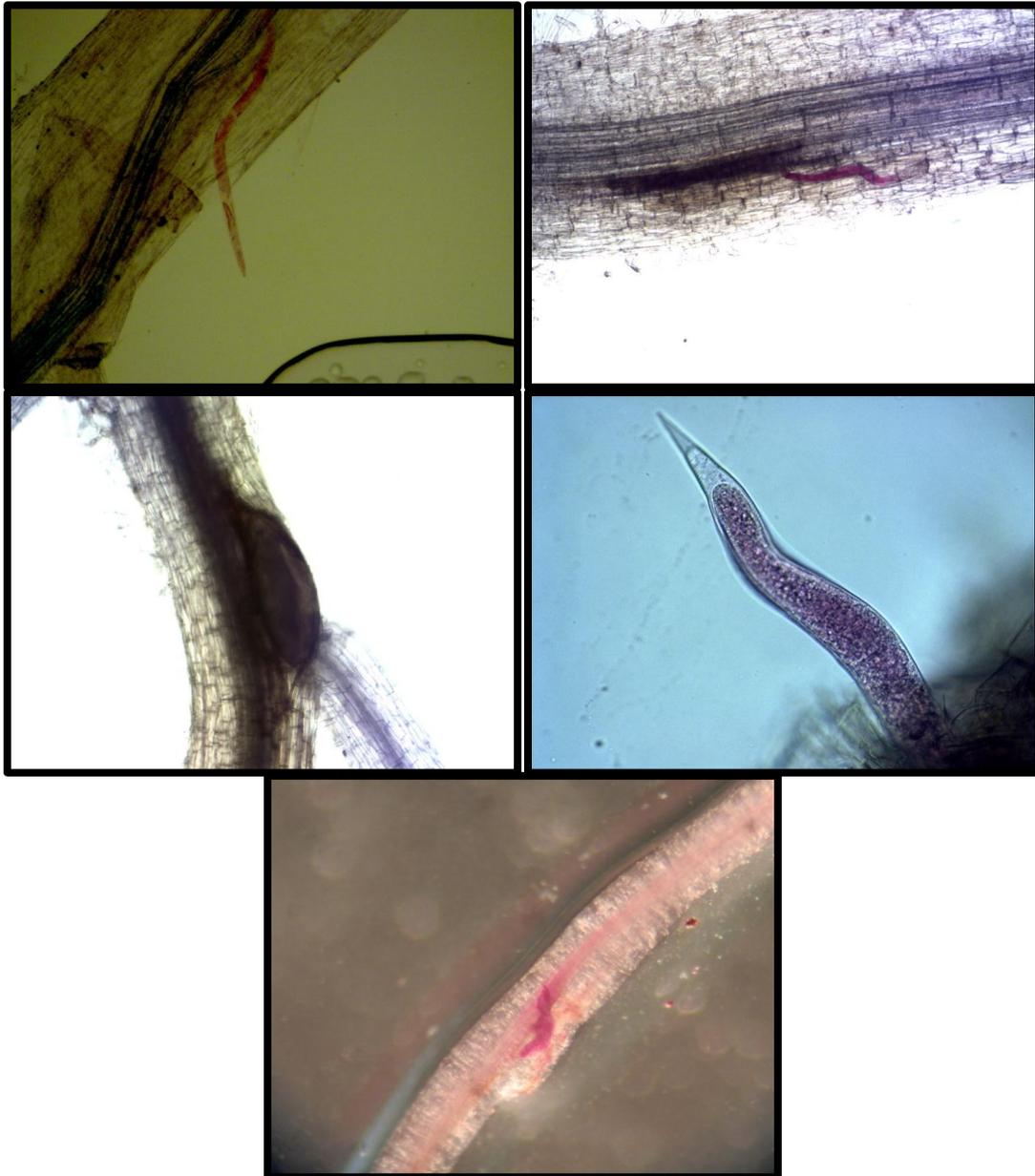


Figura 13. Tinción de raíces con tratamiento control. No se observan daños visibles a las larvas, ni dificultad en su infección a la raíz.

4.5.5.2 Tinción de raíces: Tratamiento con B6 *Serratia marcescens*

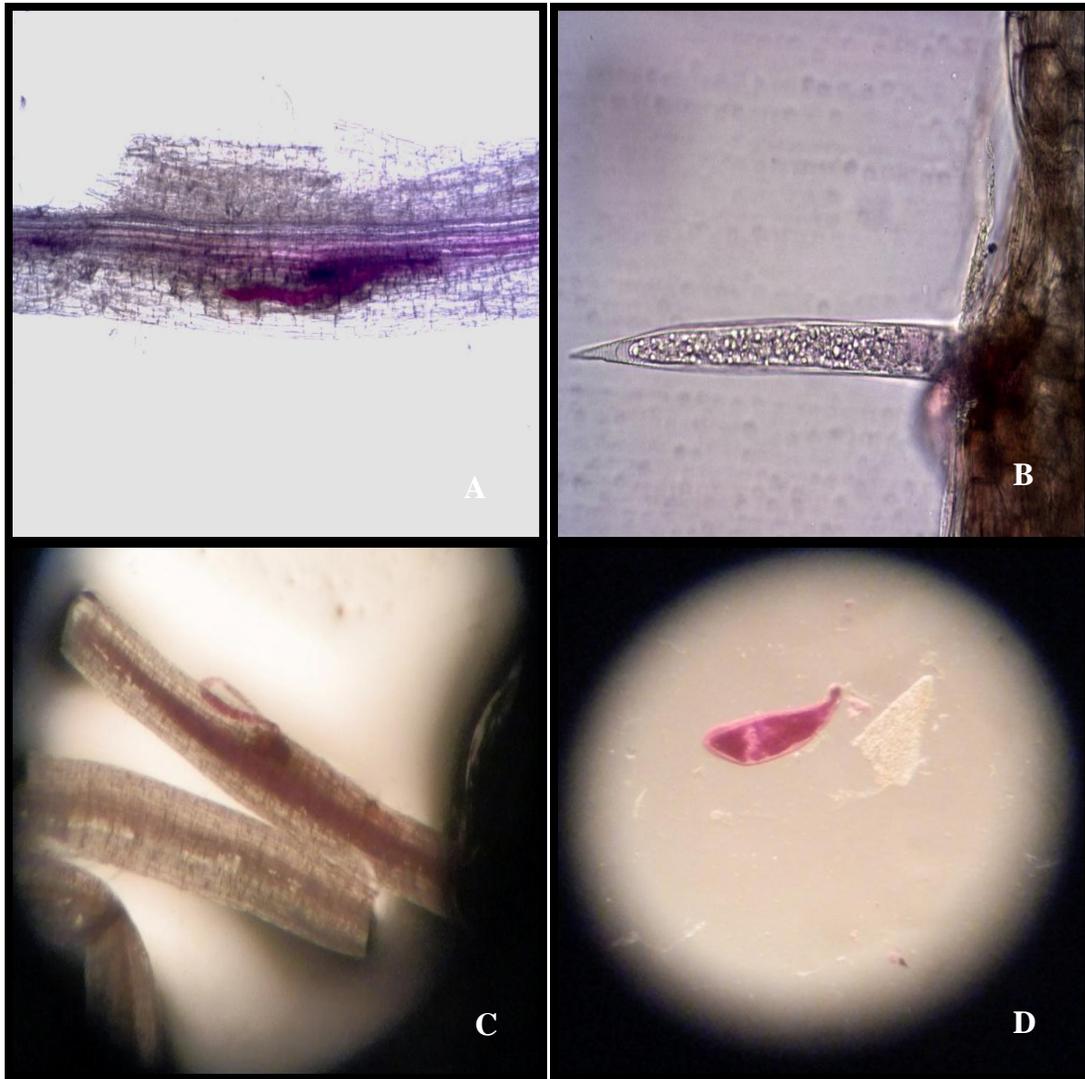


Figura 14. Tinción de raíces teñidas presentando la infección de larvas de *H. glycines* a plantas tratadas con la bacteria *Serratia marcescens* (B6). (A) muestra la infección de la larva la cual atravesó la corteza hasta llegar al cilindro vascular creando un sincicio o área de alimentación donde succiona los fluidos vasculares de la planta. (D) Podemos apreciar un desarrollo aparentemente normal la larva está en estado J4.

4.5.5.2 Tinción de raíces: Tratamiento con B10 *Pseudomonas sp. NJ-22*

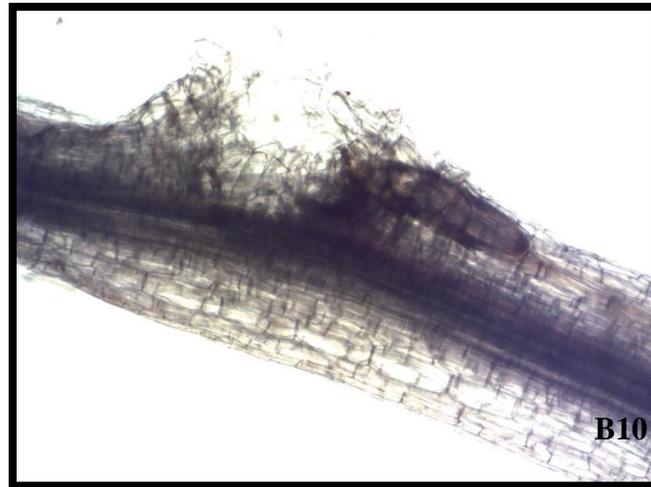


Figura 15. Tinción de raíz con el Tratamiento B10. De las pocas infecciones que se observaron en las raíces de plantas inoculadas con *Pseudomonas sp. NJ-22* (B10), vemos un nematodo en estado de larva J3- J4 creando un sincicio dentro de la raíz.

4.6 Evaluación de daño hacia huevos y larvas de *H. glycines* por parte de las bacterias *Serratia marcescens* y *Pseudomonas sp. NJ-22*.

4.6.1 Interacción de huevos, larvas y quistes de *H. glycines* con la bacteria *Serratia marcescens*.

En el tratamiento de la bacteria *Serratia marcescens* en interacción directa con las etapas de huevo y larva de *H. glycines*, ésta mostró actividad antagonista desde el segundo día de inóculo. La escala de daño hacia estas etapas no fue muy significativa a nivel poblacional ya que aproximadamente sólo un 20% se vio afectado en el transcurso del experimento. La colonización

de los huevos por parte de la bacteria observada en la figura 16, es un ejemplo de un comportamiento agresivo y antagonista sobre el nematodo. En esta figura también podemos apreciar distintas etapas de maduración del huevo y la actividad colonizadora de la bacteria. Sin embargo, no todos los huevos en la prueba fueron colonizados (figura 17 A). En la figura 17 podemos apreciar la diferencia de un huevo internamente colonizado y una larva eclosionando sin daño visible. En la figura 17 (C y D) se observa el segundo estado larval con una coloración rojiza, que se asume es el desarrollo de la bacteria, en los órganos internos. La figura 18 nos muestra un quiste que se abrió mecánicamente, luego de haber estado en incubación con la bacteria *Serratia marcescens* por 5 días. Al ver el contenido de su interior, la condición de los huevos y las larvas era similar a quistes que no estuvieron en contacto con ninguna bacteria. Aparentemente, la bacteria no es capaz de acceder al interior del quiste. Se pudo apreciar movilidad en las larvas, mientras que los huevos no mostraron colonización bacterial. Al cabo de los 5 días se le aplicó la técnica de NaOH 1N y vimos que de 10 larvas solo una mostró movimiento. La prueba de control también mostró resultados similares en cuanto a movimiento, sin embargo las larvas dentro del quiste presentaron mayor movilidad con más de un 60%.



Figura 16. Infección de *Serratia marcescens* en huevos de *H. glycines* 100X. (A) Huevo atrofiado luego de infección con la bacteria. (B) Huevo colonizado internamente por la bacteria. (C) Principio de colonización de la bacteria desde la capa exterior del huevo. (D) Larva ya formada dentro del huevo infectada con la bacteria.

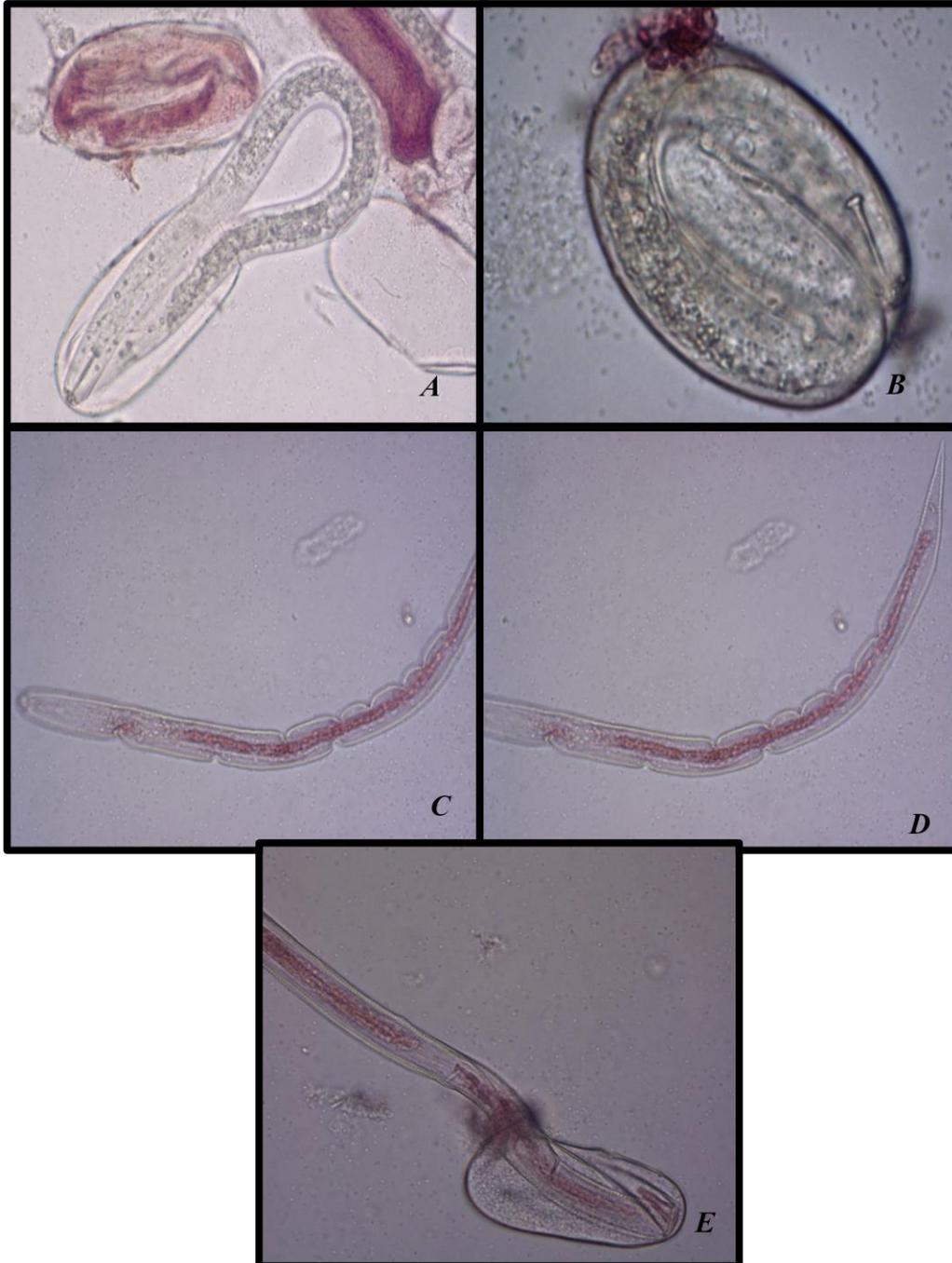


Figura 17. Infección de *Serratia marcescens* a larvas de *H. glycines*. (A) 40X Vemos un huevo colonizado con la bacteria sin embargo la larva eclosionando del otro huevo, no presenta infección bacteriana. (B) 100X Huevo en desarrollo de larva J2, en principios de colonización bacteriana en su exterior. (C y D) 40X Larva colonizada en su interior por la bacteria. (E) 40X Larva infectada eclosionando del huevo.



Figura 18. Quiste de *H. glycines* que estuvo en contacto directo con *Serratia marcescens* por 5 días. (A) 30X Quiste abierto mecánicamente muestra larvas vivas y huevos sin daño aparente. (B) Quiste en solución con la bacteria (visto bajo el estereoscopio).

4.6.2 Interacción de huevos, larvas y quistes de *H. glycines* con la bacteria *Pseudomonas* sp NJ-22.

La actividad observada de la bacteria *Pseudomonas* sp. NJ-22, con las larvas y huevos no se pudo apreciar claramente ya que esta bacteria, aunque es móvil por sus flagelos, es hialina. En la figura (19 A) se puede apreciar una nube bacteriana pegada a la cutícula de la larva, que está eclosionando del huevo. La larva (figura 19 D) presenta una colonización bacteriana en la parte posterior de la misma. Podemos observar también que varias larvas (figura 19 B y C) presentan daño en el armazón cefálico. Del ensayo no se puede determinar si el daño al armazón fue a consecuencia de la bacteria u otro factor externo. En los huevos no se vio destrucción del cascarón como se detectó con la bacteria *S. marcescens*. Los quistes en la solución con la bacteria *Pseudomonas* sp. NJ-22, presentaron colonización externa por parte de la mismas, sin embargo a los 5 días de incubación se abrieron mecánicamente y los huevos y larvas no

presentaban daño visible y las larvas tenían movilidad (Figura 20). Una vez más, el quiste no permitió la colonización bacteriana a tejidos internos del nematodo. Al aplicar la técnica de NaOH 1N a larvas del nematodo observamos que de 10 larvas seleccionadas al azar, sólo dos mostraron movilidad.

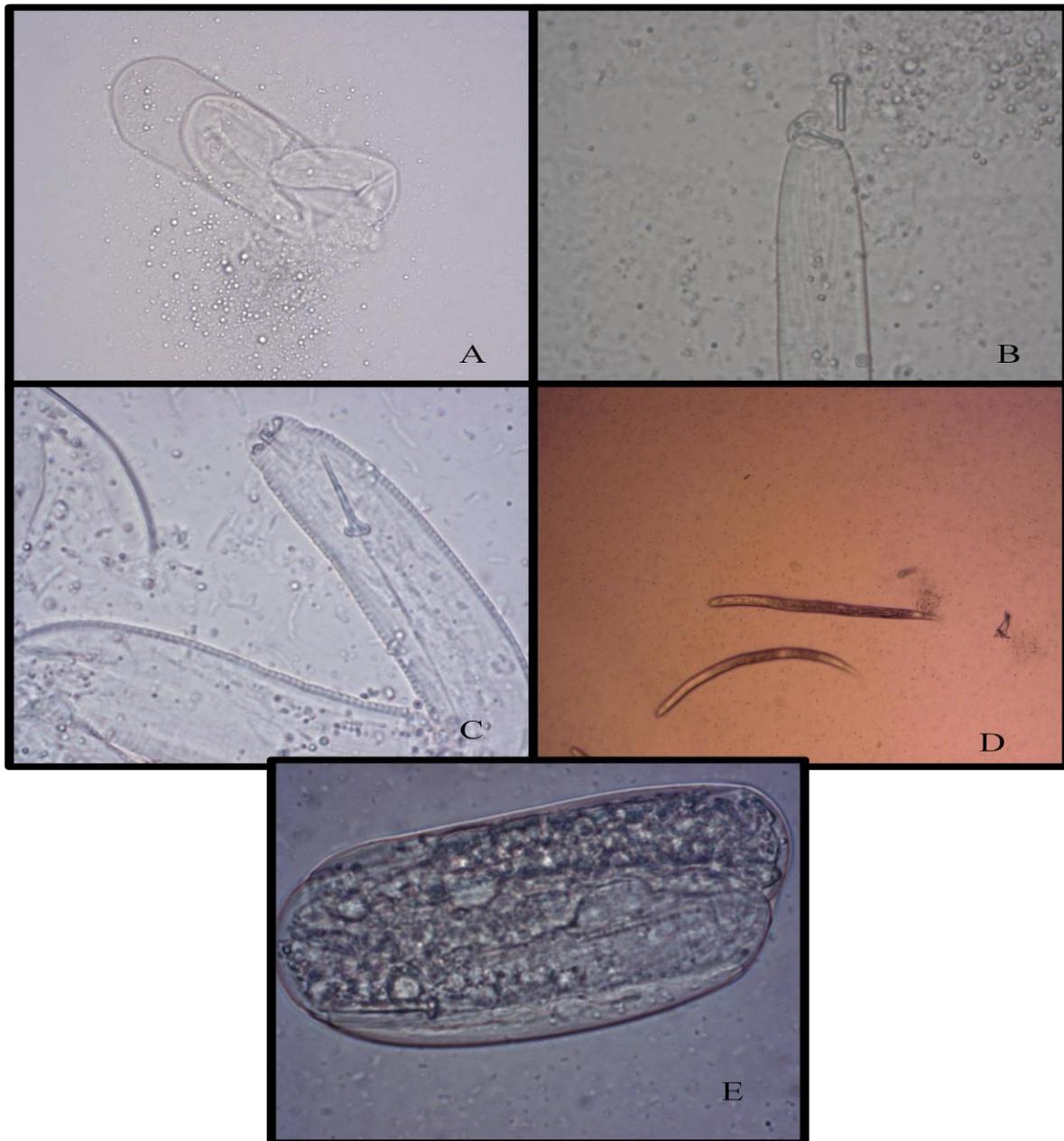


Figura 19. Huevos y larvas en interacción con la bacteria *Pseudomonas sp. NJ-22*. (A) 40X Larva eclosionando del huevo con una nube bacteriana tratando de colonizar. (B) 40X Armazón cefálico destruido y nube bacteriana colonizando. (C) 40X Armazón cefálico atrofiado. (D) 30X

Nube bacteriana pegada a la cola de una larva. (E) 100X Huevo sin daño aparente por parte de la bacteria.

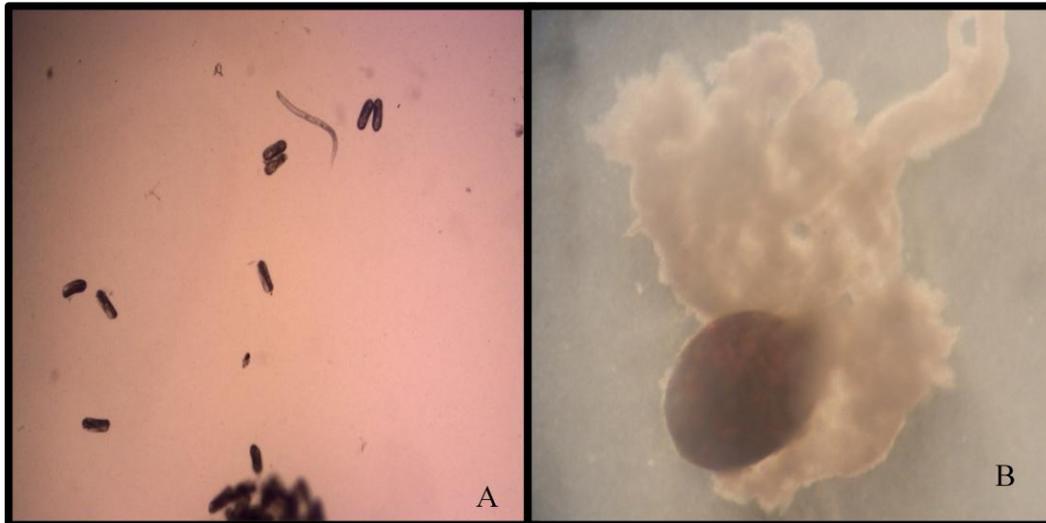


Figura 20. Quiste de *H. glycines* luego de 5 días en interacción con *Pseudomonas sp. NJ-22*. (A) 10X Quiste abierto mecánicamente luego de 5 días en interacción con la bacteria, se vio movilidad en las larvas. (B) Quiste envuelto en nube bacteriana blanca en el medio mínimo M-9 (visto desde el estereoscopio).

5. DISCUSIÓN

El nematodo de quiste de la soya, en Puerto Rico, está acompañado por bacterias enemigas. Como resultado del muestreo, se logró aislar y evaluar dos cepas bacterianas que mostraron cierto antagonismo sobre el nematodo en diferentes expresiones. Cabe mencionar que la digestión enzimática nos mostro una población más abundante de la bacteria *Pseudomonas* sp. NJ-22 en la muestra al ver que siete de doce bacterias aisladas correspondieron a esta bacteria. En los ensayos realizados en interacción con las plantas de soya cultivar Lee 74, vimos que la bacteria *Pseudomonas* sp. NJ-22, redujo el grado de infección de larvas de *Heterodera glycines* a las raíces de las plantas. En contraste, la bacteria *Serratia marcescens* no fue efectiva en reducir la infección de las larvas a las raíces. Aparentemente, el efecto de *Pseudomonas* NJ-22 se expresa directamente a la larva, mientras que en *Serratia* su efecto se concentra a las etapas más tempranas de desarrollo. Esta aseveración se fundamenta en los resultados obtenidos en el ensayo donde se estudió la interacción directamente entre las bacterias y las etapas de huevo y larvas del nematodo. En este ensayo *S. marcescens* mostró una capacidad antagonista ante las etapas de huevo y larvas recién eclosionadas que aparentaron ser colonizadas internamente y de forma agresiva. Sin embargo, *Pseudomonas* NJ-22 no mostró esta agresividad, aunque si se detectó la destrucción de huevos y larvas de *H. glycines*. Evidencia de este efecto fue la nube bacteriana adherida a la cutícula de larvas inmóviles. Esto se consideró como un episodio de parasitismo por parte de la bacteria.

Ante esto, podemos atribuir la capacidad controladora de estas bacterias a características antes descritas por varios científicos ya mencionados en la literatura. Si la actividad controladora de la bacteria depende de reducir la infección del nematodo a la raíz, y no muestra efecto negativo a huevos y larvas, posiblemente la actividad de *Pseudomonas* NJ-22 es basado

en la producción de un metabolito nematotóxico o el resultado de una interacción con la planta (Tian et al., 2007). Varios estudios realizados por Timper y colaboradores (2009), aseguran que el efecto supresor y biocontrolador sobre nematodos de varias cepas de *Pseudomonas* se debe a la producción del antibiótico 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG). Este antibiótico se ha sido reportado como antihelmíntico, lo cual es una sustancia que destruye o previene el desarrollo de parásitos gusanos como nematodos (Thomashow y Weller, 1996). Por otro lado, Sikora et al. (1993), mencionan que las rizobacterias pueden interferir con el proceso de exudado de raíces, bloqueando las áreas receptoras en las raíces o modificando los exudados de tal manera que evite la atracción de nematodos o la eclosión de huevos. Tian y colaboradores (2007), también mencionan el efecto de las rizobacterias como *Pseudomonas* en las raíces las cuales al colonizarlas cambian la composición química creando una barrera ante el ataque de patógenos. A pesar que no se detectó un efecto claro de *Pseudomonas* NJ-22 sobre los huevos del nematodo, no podemos descartar que la producción de quitinasa está relacionada con el efecto antagonista y la degradación de algunas proteínas esenciales presentes en la cutícula del nematodo.

El efecto antagonista de la bacteria *Serratia marcescens* se caracterizó por la degradación y colonización interna de los huevos y larvas del nematodo. Esta bacteria no fue efectiva reduciendo la infección del nematodo a las raíces de soya cultivar Lee 74. Interesantemente, la colonización no fue a todos los huevos y larvas ya que hubo huevos y larvas que no presentaron daño. A pesar que en la literatura no se reporta parasitismo de nematodos por parte de *Serratia*, nuestros resultados revelan que esta bacteria logra entrar al interior de las larvas y huevos y colonizar los tejidos internos. Más aun, al parecer hay etapas embrionarias del huevo que son más propensas a su invasión. Sin embargo, en este estudio no se intentó re-aislar la bacteria del interior de los huevos y larvas colonizadas. Para corroborar si existe parasitismo

es necesario realizar esta prueba. En efecto, esta bacteria mostró poseer la capacidad para infectar estas dos etapas del nematodo causándole la muerte. Este mecanismo se le puede atribuir a su capacidad agresiva de degradar quitina presente en el huevo y otras proteínas, dato observado en la prueba de degradación del medio de quitina y mencionado en varios estudios (Perry y Marcus, 1986). Regaieg et al. (2010), mencionan que la combinación de proteasas y quitinasas podrían destruir las capas de lípidos de los huevos de *Heterodera*, hidrolizar la quitina y alterar la capa de vitelina, perdiendo como consecuencia permeabilidad y rigidez. Esta bacteria fue usada como bio-controlador efectivo por Mohamed et al. (2009), en plantas de habichuela con el nematodo del genero *Meloidogyne*. El cual también atribuyó su capacidad quitinolítica a la inducción de la eclosión prematura de huevos, inhibiendo así su desarrollo.

Según los resultados obtenidos y sostenidos por estudios previos las bacterias *Serratia marcsecens* y *Pseudomonas* sp. NJ-22 poseen características antagonistas sobre el nematodo de quiste de la soya (*H. glycines*) y pudiera considerarse como posible alternativa de control en el futuro. Estudios futuros deberían determinar el mecanismo de acción así como la concentración necesaria de estos organismos en el suelo para obtener resultados significativos.

6. CONCLUSIONES

- Dos bacterias resultaron ser positivas en la producción de enzimas capaces de degradar quitina y caseína
- Las dos bacterias estudiadas fueron identificadas como *Pseudomonas* sp. NJ-22 y *Serratia marcescens*
- La bacteria identificada como *Pseudomonas* sp. NJ-22 redujo la infección de larvas de *Heterodera glycines* en plantas de soya variedad Lee 74.
- La bacteria identificada como *Serratia marcescens* no mostró efecto supresor sobre la infección de larvas de *H. glycines* a las raíces de soya variedad Lee 74, pero sí fue efectiva colonizando los huevos y larvas del nematodo.

7. RECOMENDACIONES

- Realizar el experimento a nivel de maduración de la planta para evaluar otros factores envueltos en el efecto de las bacterias.
- Utilizar diferentes concentraciones de bacteria en todos los ensayos para evaluar la población versus su efecto.
- Analizar métodos para utilizar ambas bacterias a nivel de campo como medio de control o prevención.
- Analizar algún método para inocular las semillas de soya con la bacteria *Pseudomonas* sp. NJ-22.
- Evaluar la interacción de ambas bacterias (*Serratia marcescens* y *Pseudomonas* sp. NJ-22.) como posible control.
- Evaluar el mecanismo de acción de ambas bacterias sobre *H. glycines*.

8. LITERATURA CITADA

- Bird, A. F. y McClure, M. A. 1976. The tylenchid (Nema-toda) egg shell : structure, composition and permeability. *Parasitology* 72 : 19-28.
- Bogo, M.R., Rota, C.A., Pinto, H., Ocampos, M., Correa, C.T., Vainstein, M.H. y Shrank, A. 1998. A Chitinase Encoding Gene (*Chit 1* Gene) from the Entomopathogen *Metarhizium anisopliae*: Isolation and Characterization of Genomic and full-length cDNA. *Current Microbiology* 37: 221- 225.
- Chen, S.Y. y Dickson D. W. 2000. A Technique for Determining Live Second-stage Juveniles of *Heterodera glycines*. *Journal of Nematology* 32: 117-121.
- Chen, S., MacDonald, D.H., Kurle, J.E. y Reynolds, D.A. 2001. The Soybean Cyst Nematode. St. Paul, MN: University of Minnesota Extension Service. FO-03935-S. www.extension.umn.edu
- Dwevedi, A y Kayastha, A. M. 2011. Soybean: a Multifaceted Legume with Enormous Economic Capabilities, Soybean - Biochemistry, Chemistry and Physiology, Prof. Tzi-Bun Ng (Ed.), ISBN: 978-953-307-219-7.
- Fenoll, C. y Del Campo, F. F.. 1998. The molecular basis of nematode endoparasitism in plants. *Physiology Molecular Biology Plants* 4: 9-18.
- Gamundi, J. C., Bodrero, M., y Lago, M. E. 2002. Nematodo del quiste de la soja. *Idia XXI revista de información sobre investigación y desarrollo agropecuario* 2: 83-87
- Grobkopf, R., Janssen, P.H. y Liesack, W. 1998. Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosm as examined by cultivation and direct 16S rRNA sequence retrieval. *Applies and Enviromental Microbiology* 64: 960-969.
- Hsu, S.C y Lockwood, J.L. 1975. Powered chitin agar as a selective medium for enumeration of Actinomycetes in water and soil. *Applied Microbiology* 29: 422-426.
- Kamil, Z., Rizk, M., Saleh, M. y Moustafa, S.. 2007. Isolation and Identification of Rhizosphere Soil Chitinolytic Bacteria and their Potential in Antifungal Biocontrol. *Global Journal of Molecular Sciences* 2 : 57-66.
- Khan, M., Hamid R., Ahmad M., Abdin M. y Javed, S. 2010. Optimization of culture media for enhanced chitinase production from a novel strain of *Stenotrophomonas maltophilia* using response surface methodology. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 20: 1597–1602
- Khan, R., Alkharouf, N. H., Beard, M. MacDonald, I. Chouikha, S. Meyer, J. Grefenstette, H. Knap y B. Matthews. 2004. Microarray Analysis of Gene Expression in Soybean Roots Susceptible to the Soybean Cyst Nematode Two Days Post Invasion. *Journal of Nematology* 36: 241-248.

- Kim, D., Riggs, R., Robbins, R. y Rakes, L. 1997. Distribution of Races of *Heterodera glycines* in the Central United States. *Journal of Nematology* 29 : 173- 179
- King, E.O., Ward, M.K. y Raney, D.E., 1954. Two simple media for the demonstration of phycocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 44, 301–307.
- Mohamed, Z., El-Sayed, S.A., Radwan, T.E.E y Ghada S. 2009. Potency Evaluation of *Serratia marcescens* and *Pseudomonas fluorescens* as Biocontrol Agents for Root-knot Nematodes in Egypt. *Journal of Applied Sciences Research* 4: 93-102
- Mosa, O., Nae'l Abu A., Kamel, A. y Naim I. 2000. Interaction between the biocontrol agents; Entomopathogenic nematodes, *Serratia marcescens* and *Bauveria bassiana* isolated from Palestine. Tesis M.S. An-Najah National University, Nablus, Palestine. pp. 100
- Nandakumar, R., Babu, S., Raguchander, T. y Samiyappan, R.. 2007. Chitinolytic Activity of Native *Pseudomonas fluorescens* strains. *Journal Agriculture Science Technology* vol 9: 61 -68
- NCBI 2014. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechRFLP.shtml>
- Oka, Y. y Pivonia, S. 2002. Use of ammonia-releasing compounds for control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Nematology* 4: 65-71.
- Oka, Y., Chet, I. y Spiegel, Y. 1993. Control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Bacillus cereus*. *Biocontrol Science Technology*. 3: 115-126.
- Opperman, C. y Bird, D., 1998. The soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*: a genetic model system for the study of plant-parasitic nematodes. *Current Opinion in Plant Biology* 1: 342-346.
- Palmateer, A.J., Schmidt, M.E., Stretina S.R. y Russin, J.S.. 2000. Temperature Effects on Race Determination in *Heterodera glycines*. *Journal of Nematology* 32: 349-355.
- Perry, R. y Marcus T. 1986. Ultrastructure of the eggshell of *Heterodera schachtii* And *H. Glycines* (nematoda : tylenchida). *Revista de Nematologia* 9: 399-403
- Ponce, M., Ortiz R., de la Fé C. y Moya C. 2002. Estudio comparativo de nuevas variedades de soya (*Glycine max* (L.) Merr) para las condiciones de primavera en Cuba. *Cultivos Tropicales* 23: 55-58
- Ravichandra N.G. 2010. Methods and techniques in Plant. Nematology. Publicado por Asoke K. Ghosh. pp. 616.
- Regaieg, H., Aurelio C., Najet H. y Laura R. 2010. Effects of culture filtrates from the nematophagous fungus *Verticillium leptobactrum* on viability of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *World J Microbiology Biotechnology* (2011) 27:1615–1623.

- Riggs, R. D., y Schmitt, D. P. 1991. Optimization of the *Heterodera glycines* race test procedure. *Journal of Nematology* 23:149–154.
- Riggs, H. T. 2000. Effects of Rhizobacteria on Soybean Cyst Nematode, *Heterodera glycines*. *Journal of Nematology* 32: 377-388.
- Schmitt, D.P. 1991. Management of *Heterodera glycines* by Cropping and Cultural Practices. *Journal of Nematology* 23: 348-352.
- Shadmehr, A., Payman N., Ghasemali G. y Ali-Reza A., 2007. Study of Sugar Beet Cyst Nematode Life Cycle Using Plant Tissue Culture Method. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 10: 2910-2914.
- Sikorowski, P.P. y Lawrence, AM. 1998. Transmission of *Serratia marcescens* (Enterobacteriaceae) in adult *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) Laboratory colonies. *Biological Control* 12: 50-55
- Singh, G. 2010. The Soybean, Botany, Production and Uses. In G. Singh, The Soybean, Botany, Production and Uses. London, UK: CAB International.
- The American Soybean Association. 2013. A Reference Guide to Important Soybean Facts & Figures. http://soystats.com/wp-content/uploads/ASA_SoyStats_fnl.pdf
- Stirling, G. R. 1991. Biological control of plant parasitic nematodes: Progress, Problems and Prospects. CAB. International, Wallingford, UK: 282pp.
- Tian, H., Robert D. y Devany C. 2000. Control of Soybean Cyst Nematode by Chitinolytic Bacteria with Chitin Substrate. *Journal of Nematology* 32: 370-376.
- Tian, B., Yang, J. y Zhang, K.. 2007. Bacteria used in the Biological control of plant parasitic nematodes: Population, mechanism of action and future prospects. *FEMS Microbiology Ecology* 61: 197-213.
- Timper, P., Daouda K., Jingfang Y., Pingsheng J. y Brian M. 2009. Evaluation of an Antibiotic-Producing Strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Nematology* 41: 234–240.
- Tirado, O., Rosado, W. y Nadathur, G.S. 2005. Characterization of bacteria with carbohydrase activities from tropical ecosystems. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 85: 269-275.
- Vega, B.P. 2009. Etiología de la Roya Americana de la soya, *Phakospora meibomia* Arthur, En Puerto Rico. Tesis M.S. Universidad de Puerto Rico, Mayagüez P.R., 139pp
- Viswanathan, R. y Samiyappan, R. 2001. Antifungal Activity of Chitinase Produced by Fluorescent Pseudomonads against *Coletotrichum falcaturn* Went Causing Redroot Disease in Sugarcane. *Microbiological Research*, 155: 305-314.

APÉNDICE 1

Secuencias de Bacterias Aisladas Seleccionadas

Bacteria B10:

Pseudomonas sp. NJ-22 16S rRNA gene, strain NJ-22.

AM421975

Length = 1498

Score = 1033 bits (521), Expect = 0.0

Identities = 521/521 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 agagtttgatcctggctcagattgaacgctggcggcaggcctaacacatgcaagtcgagc 60
|||||

Sbjct: 1 agagtttgatcctggctcagattgaacgctggcggcaggcctaacacatgcaagtcgagc 60

Query: 61 ggtagagagaagcttgcttctcttgagagcggcggacgggtgagtaatacctaggaatct 120
|||||

Sbjct: 61 ggtagagagaagcttgcttctcttgagagcggcggacgggtgagtaatacctaggaatct 120

Query: 121 gcctgatagtgggggataacgttcggaacggacgctaataccgcatacgtcctacggga 180
|||||

Sbjct: 121 gcctgatagtgggggataacgttcggaacggacgctaataccgcatacgtcctacggga 180

Query: 181 gaaagcaggggaccttcgggccttgcgctatcagatgagcctaggtcggattagctagtt 240
|||||

Sbjct: 181 gaaagcaggggaccttcgggccttgcgctatcagatgagcctaggtcggattagctagtt 240

Query: 241 ggtgaggtaatggctcaccaaggctacgatccgtaactggtctgagaggatgatcagtc 300
|||||

Sbjct: 241 ggtgaggtaatggctcaccaaggctacgatccgtaactggtctgagaggatgatcagtc 300

Query: 301 cactggaactgagacacgggccagactcctacgggaggcagcagtggggaatattggaca 360
|||||

Sbjct: 301 cactggaactgagacacgggccagactcctacgggaggcagcagtggggaatattggaca 360

Query: 361 atgggcgaaagcctgatccagccatgccgctgtgtgaagaaggtcttcggattgtaaag 420
|||||

Sbjct: 361 atgggcgaaagcctgatccagccatgccgcgtgtgtgaagaaggcttcggattgtaaag 420

Query: 421 cactttaagtgggaggaagggcagttacctaatacgtgattgtcttgacgtaccgaca 480

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct: 421 cactttaagtgggaggaagggcagttacctaatacgtgattgtcttgacgtaccgaca 480

Query: 481 gaataagcaccggctaactctgtgccagcagccgcgtaat 521

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct: 481 gaataagcaccggctaactctgtgccagcagccgcgtaat 521

Query: 419 ttcgggttgtaaagcacttcagcgaggaggaaggtggtgagcttaatacgttcatcaat 478

|||||

Sbjct: 413 ttcgggttgtaaagcacttcagcgaggaggaaggtggtgagcttaatacgttcatcaat 472

Query: 479 tgacgttactgcagaagaagcaccggctaactccgtgccagcagccgcggtaat 533

|||||

Sbjct: 473 tgacgttactgcagaagaagcaccggctaactccgtgccagcagccgcggtaat 527

APENDICE 2. ANOVAS

ANOVA : Medidas de Altura

Medidas de Altura por 15 días

<i>Grupos</i>	<i>Cantidad</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Control	5	73.72	14.744	42.79468
Nematodo	5	71.5	14.3	40.685
Serratia marcescens	5	70.5	14.1	36.805
Serratia marcescens+ nem	5	73.1	14.62	45.467
Pseudomonas sp. NJ-22	5	71.28	14.256	39.17108
Pseudomonas sp. NJ-22 + nem	5	70.32	14.064	38.98148

ANOVA

<i>Fuente de variación</i>	<i>SC</i>	<i>gl</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>P-valor</i>	<i>F crit</i>
Entre grupos	1.918627	5	0.383725	0.00944	0.999971	2.620654
Dentro del grupo	975.617	24	40.65071			
Total	977.5356	29				

ANOVA: Peso fresco de plantas

Peso fresco de plantas

<i>Groupos</i>	<i>Cantidad</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Control	5	27.63	5.526	1.11523
Nematodo	5	27.02	5.404	3.55073
Serratia marcescens	5	26.79	5.358	5.29897
Serratia marcescens+ nem	5	29.36	5.872	1.90252
Pseudomonas sp. NJ-22	5	27.85	5.57	1.64475
Pseudomonas sp. NJ-22 + nem	5	21.59	4.318	3.26852

ANOVA

<i>Fuente de variación</i>	<i>SC</i>	<i>gl</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>P-valor</i>	<i>F crit</i>
Entre grupos	7.097067	5	1.419413	0.507516	0.7677	2.620654
Dentro del grupo	67.12288	24	2.796787			
Total	74.21995	29				

 $\alpha = 0.05$

ANOVA: Peso de raíz

Peso de raíz

<i>Groupos</i>	<i>Cantidad</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Control	5	8.94	1.788	0.28442
Nematodo	5	10.08	2.016	0.49453
Serratia marcescens	5	8.97	1.794	0.95963
Serratia marcescens+ nem	5	9.02	1.804	0.27093
Pseudomonas sp. NJ-22	5	9.61	1.922	0.11887
Pseudomonas sp. NJ-22 + nem	5	5.56	1.112	0.17832

ANOVA

<i>Fuente de variación</i>	<i>SC</i>	<i>gl</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>P-valor</i>	<i>F crit</i>
Entre grupos	2.564986667	5	0.512997333	1.334366844	0.283654429	2.620654147
Dentro del grupo	9.2268	24	0.38445			
Total	11.79178667	29				

$\alpha = 0.05$

ANOVA: Cantidad de infección a

raíces

Cantidad de Infección a raíces

<i>Grupos</i>	<i>Cantidad</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>	
Nematodo	5	37	7.4	3.8	a
Bac 6	5	30	6	3.5	a
Bac 10	5	8	1.6	3.3	b

ANOVA

<i>Fuente de variación</i>	<i>SC</i>	<i>gl</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>P-valor</i>	<i>F crit</i>
Entre grupos	91.6	2	45.8	12.9623	0.001	3.88529
Dentro del grupo	42.4	12	3.53333			
Total	134	14				

$\alpha = 0.05$

LSD = 2.587

APENDICE 3

M9 Minimal medium recipe

M9 Minimal Medium

Per liter:	Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	12.8g
	<i>OR</i>	
	Na ₂ HPO ₄ (<u>anhydrous</u>)	6 g
	KH ₂ PO ₄	3 g
	NaCl	0.5 g
	NH ₄ Cl	1 g

- add a carbon source (glucose, sodium gluconate, or glycerol) to 0.2% (v/v) final volume
- pH to 7.4 with NaOH
- Autoclave and then add sterile micronutrient components to a final concentration of:

<u>Stock Concentration</u>	<u>Micronutrient</u>	<u>Final Concentration</u>
1 M	MgSO ₄	1 mM
1 M	CaCl ₂	100 μM
3 mM	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	3x10 ⁻⁹ M
400 mM	H ₃ BO ₃	4x10 ⁻⁷ M
30 mM	CoCl ₂ ·6H ₂ O	3x10 ⁻⁸ M
10 mM	CuSO ₄ ·5H ₂ O	1x10 ⁻⁸ M
80 mM	MnCl ₂ ·4H ₂ O	8x10 ⁻⁸ M
10 mM	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1x10 ⁻⁸ M
5 mM	FeSO ₄ ·7H ₂ O§	1x10 ⁻⁶ M

- I recommend filter sterilization for all micronutrients
- FeSO₄ must be made fresh and filter sterilized immediately before use. This solution is extremely prone to oxidation and precipitation, but may be frozen in aliquots.

Alternatively, make a 10X solution of the M9 salts, a 1000X mixed solution of the (NH₄)₆Mo₇O₂₄, H₃BO₃, CoCl₂, CuSO₄, MnCl₂, and ZnSO₄ and mix that with the appropriate FeSO₄, MgSO₄, CaCl₂, and carbon source (with any antibiotics, arabinose, etc., etc.)

*For 250mL of M9 solid medium (*autoclaved separately)*

<u>Component</u>	<u>Volume</u>	<u>Final concentration</u>
1.5% (w/v) agar in MQ water*	200 mL	1% (w/v)
10X M9 salts*	25 mL	1X
20% (w/v) carbon source	2.5 mL	0.2% (w/v)
1000X micronutrients	0.25 mL	1X
1M MgSO ₄	0.25 mL	1 mM
1M CaCl ₂	0.025 mL	100 μM
5 mM FeSO	0.05 mL	1 μM
Milli-Q water*	<u>21.925 mL</u>	
	250mL	