

***Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson y *Trichoderma harzianum* (Rifai)
ANTAGONISTAS DEL NEMATODO DE QUISTE DE LA SOYA *Heterodera
glycines* (Ichinohe) PRESENTES EN SUELOS DE PUERTO RICO**

Por

Yolima Andrea Arenas Buitrago

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:

Roberto Vargas Ayala, Ph.D.
Presidente, Comité Graduado

Fecha

Lydia I. Rivera Vargas, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Elide Valencia, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Rosita Rivera, Ph.D.
Representante de Estudios Graduados

Fecha

Elvin Román Paoli, Ph.D.
Director Interino del Departamento

Fecha

ABSTRACT

Soil samples were collected in four areas of Puerto Rico; three forest areas and one agricultural area cultivated with soybeans in order to isolate and identify antagonistic fungi to the soybean cyst nematode, *Heterodera glycines* (SCN). The fungi were isolated in semi-selective culture media using the serial dilutions of soil method. Fungi with nematode antagonistic characteristics were purified and retained in a culture medium of potato dextrose agar (PDA) with chitin. Four isolates of *Paecilomyces lilacinus* from soil samples collected in the forest area were identified; also a *Trichoderma harzianum* was isolated from samples of the area cultivated with soybeans. Subsequently, antagonism tests were conducted in the laboratory and greenhouse on eggs and juvenile larvae of SCN for three planting dates. To determine the degree of parasitism, the alginate films technique was used and fungal growth on cysts, larvae and eggs of the nematode was observed. In addition, greenhouse tests were conducted with soybean plants to examine the level of nematode control and the effect on plants. The results at both laboratory and greenhouse tests, showed antagonistic activity of five fungi on cysts, eggs, and larvae of SCN. Results showed that the morpho-species *P. lilacinus* had the highest incidence of parasitism on eggs and some effect on the larvae. The TN9P isolated from a forest area showed the best value regarding to results on the best the eggs parasitism. Fungi showed no negative effects on the development of soybean plants; in the case of *T. harzianum* and stimulation of the root growth was registered. These results show that isolated fungi have potential for use in a management program of SCN.

Key words: Soybean cyst nematode, *Paecilomyces lilacinus*, *Trichoderma harzianum*, antagonistic fungi, biological control.

RESUMEN

Con el fin de aislar e identificar hongos con características antagónicas al nematodo del quiste de la soya, *Heterodera glycines* (NQS), se realizaron muestreos de suelo en cuatro áreas de Puerto Rico, tres zonas forestales y una zona agrícola cultivada con soya. Los hongos se aislaron en medios de cultivo semiselectivo siguiendo el método de diluciones seriadas de suelo. Los hongos que presentaron características antagónicas a nematodos se purificaron y conservaron en medio de cultivo de papa dextrosa agar (PDA) con quitina. Se identificaron cuatro aislados de *Paecilomyces lilacinus* procedentes de las muestras de suelo del área de reserva y un aislado de *Trichoderma harzianum* procedente de las muestras del área cultivada con soya. Posteriormente, se realizaron pruebas de antagonismo a nivel de laboratorio e invernadero sobre huevos y larvas J2 de NQS durante tres fechas de siembra. Para conocer el grado de parasitismo, se utilizó la técnica de láminas de alginato y se observó el desarrollo del hongo sobre quistes, larvas y huevos del nematodo. Además, se realizaron ensayos de invernadero con plantas de soya, para examinar el nivel de control sobre el nematodo y el efecto sobre las plantas. Los resultados tanto a nivel de laboratorio como en invernadero, mostraron actividad antagónica de los cinco hongos sobre quistes, huevos y larvas de NQS, donde las morfoespecies de *P. lilacinus*., presentaron una mayor incidencia de parasitismo sobre los huevos y una leve acción sobre las larvas. El aislado TN9P procedente de un área boscosa mostro los mejores resultados antagónicos sobre huevos en comparación con los otros aislados. Los hongos no presentaron efectos negativos sobre el desarrollo de las plantas de soya, por el contrario los tratamientos con *T. harzianum* estimularon su desarrollo radicular. Los resultados obtenidos demuestran que los hongos aislados tienen potencial para utilizarse en un programa de manejo de NQS.

Palabras claves: Nematodo del quiste de la soya, *Paecilomyces lilacinus*, *Trichoderma harzianum*, hongos antagonistas, control biológico.

© *Yolima Andrea Arenas Buitrago, 2014*

***Dedicada a mi Familia Arenas Buitrago por ser mi fuerza y motivación.
Especialmente a Henry Arenas Sarria & Jesús Evelio Arenas Osorio. Por ser
mí ejemplo y enseñarme el valor de la vida y el amor por la naturaleza.***

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a Dios por permitirme estar viva y alcanzar uno más de mis proyectos. A mi hermano Jesús E. Arenas por ser mi cómplice, por patrocinar todos mis sueños y ser mi vos de aliento en los momentos más críticos de este proceso. A mis padres Henry Arenas y Melba Luz Buitrago por ser mi motivación y apoyo, porque siempre han estado allí para mí.

Al Dr. Roberto Vargas Ayala creer en mí y confiar en mis capacidades durante el desarrollo de esta investigación.

Al Dr. Elide Valencia por su apoyo, consejos y colaboración durante el progreso de mi investigación.

A la Dra. Lydia Rivera por su asesoría y colaboración en mi proceso de educativo y de investigación de maestría.

Al talento humano del Departamento de Cultivos y Ciencias Agroambientales y la Finca Alzamora por su colaboración. Especialmente a Luis Collazo, Rocío Suarez, Floripe Cancel, Evelyn Rosello y José Ariel Muñoz.

A mi familia, amigos y compañeros de maestría por su apoyo incondicional, por esas noches que parecían no tener fin, por estar allí animándome para no desistir, por esas tazas de café, por esa frase dada en el momento justo, por ese abrazo: Eliana Martínez, Olga González, Marcelino Guachambala, Odaliz Faria, Fernando L. González.

Al proyecto TSTAR 131 de la Estación Experimental Agrícola.

TABLA DE CONTENIDO

ABSTRACT	ii
RESUMEN	iii
TABLA DE CONTENIDO	vii
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. La soya <i>Glycine max</i>	4
2.2. Importancia del cultivo de soya	5
2.2.1. Problemas fitosanitarios del cultivo de soya	5
2.3. <i>Heterodera glycines</i>	6
2.3.1. Medidas de control o manejo del problema.....	7
2.4. Control biológico	8
2.4.1. Microorganismos antagónicos de nematodos	9
3. OBJETIVOS	12
3.1. Objetivo general.....	12
3.2. Objetivos específicos	12
4. MATERIALES Y MÉTODOS	13
4.1. Fase de campo.....	13
4.1.1. Toma de muestras en zonas de reserva forestal	13
4.1.2. Toma de muestras en área agrícola cultivada con soya	14
4.2. Fase de Laboratorio	15
4.2.1. Aislamiento de Hongos con Potencial Antagónico.....	15
4.3. Pruebas de Antagonismo.....	16
4.3.1. Extracción de quistes	16
4.3.2. Fijación de quistes y huevos de <i>Heterodera glycines</i> en alginato	17
4.3.3. Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i>	18
4.4. Ensayos de invernadero	20
4.5. Tinción de nematodos.....	21
4.6. Prueba de viabilidad de huevos de <i>H. glycines</i>	21
4.7. Postulados de Koch	22
4.8. Análisis estadístico	22

5. RESULTADOS	23
5.1. Muestreo y aislamiento de hongos antagonistas de nemátodos	23
5.2. Actividad antagónica in vitro	26
5.3. Actividad antagónica en invernadero	30
5.4. Nematodos en la raíz de soya	35
5.5. Postulados de Koch	37
6. DISCUSIÓN	41
7. CONCLUSIONES	45
8. RECOMENDACIONES	46
9. LITERATURA CITADA	47
10. APÉNDICES	52

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características macroscópicas y microscópicas de los hongos aislados de cuatro puntos geográficos diferentes de Puerto Rico	24
Tabla 2. Quistes de NQS parasitados por aislados de hongos antagonistas en el mes de enero 2012.....	28
Tabla 3. Huevos parasitados por aislados de hongos antagonistas durante enero de 2012 bajo condiciones de laboratorio.	28
Tabla 4. Larvas en estado J2 de NQS parasitados por aislados de hongos antagonistas durante enero de 2012 bajo condiciones de laboratorio. ..	29
Tabla 5. Huevos de NQS parasitados por aislados de hongos antagonistas en agosto de 2012, febrero y marzo de 2013 bajo condiciones de laboratorio.	29
Tabla 6. Larvas en estado J2 de NQS parasitados por hongos antagonistas durante los experimentos realizados en los meses de agosto de 2012, febrero y marzo de 2013 bajo condiciones de laboratorio.	30
Tabla 7. Huevos de NQS expuestos a cinco aislados fúngicos con potencial antagonista en experimentos de invernadero realizados en los meses de agosto de 2012 y febrero y abril de 2013.	31
Tabla 8. Larvas J2 de NQS parasitadas con los diferentes tratamientos en las tres fechas de siembra.	34
Tabla 9. Longitud de raíz de soya inoculada con los diferentes tratamientos en tres fechas de siembra.	34
Tabla 10. Peso de raíz de plantas de soya inoculadas con diferentes hongos antagonísticos en tres fechas de siembra.	35
Tabla 11. Número de larvas J2 de NQS en raíz de plantas inoculadas con hongos antagonísticos durante tres fechas de siembra.	36
Tabla 12. Número de hembras de NQS teñidas en raíz de plantas inoculadas con seis aislados de hongos antagonísticos durante tres fechas de siembra.....	36

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Zonas muestreadas: (1) Bosque Estatal de Toro Negro, (2) Bosque Estatal de Monte Guilarte, (3) Bosque Estatal de Rio Abajo y (4) Cultivo de soya en el municipio de Isabela. 14
- Figura 2. Patrón de muestreo en cultivo de soya. 15
- Figura 3. *P. lilacinus*. (a) Aislado TN10A colonia con 12 días de desarrollo en PDA; (b) Aislado TN10B colonia con 12 días de desarrollo en PDA; (c) aislado TN9P colonia con 12 días de desarrollo en PDA; (d) aislado TN9C colonia con 12 días de desarrollo en PDA. 25
- Figura 4. *Trichoderma harzianum*. (a) colonia con 12 días de desarrollo en PDA; (b) conidióforo y conidias observadas a 40X de aumento. 25
- Figura 5. Crecimiento micelial del aislado TN 9P de *P. lilacinus* después de ocho días de inoculado en medio PDA y PDA con quitina. (a) Crecimiento en medio PDA con quitina y (b) Crecimiento micelial en medio PDA sin quitina. Se observa que los aislados sembrados en el medio de cultivo modificado presentaron un mejor desarrollo. 26
- Figura 6. *P. lilacinus* parasitando quistes y huevos de NQS. (a) quiste de NQS con presencia de micelio de color lila en la parte inferior observado a 10X de aumento; (b) huevo traslucido de NQS con presencia de micelio sobre su cubierta, observado a 40X. 26
- Figura 7. Quistes y huevos de NQS. (a) quiste de NQS sin presencia de micelio en la superficie observado a 10X de aumento; (b) huevo traslucido de NQS sin presencia de micelio sobre su cubierta, observado a 40X. 27
- Figura 8. *T. harzianum* parasitando quistes y huevos de NQS. (a) quiste de NQS con presencia de micelio de color verde oliva cubriendo toda la superficie de la estructura quística observado a 10X de aumento; (b) Dos huevos traslucidos de NQS con presencia de micelio sobre su cubierta, observado a 40X. 27
- Figura 9. Huevos de NQS parasitados por los diferentes aislados de hongos antagonicos. 32
- Figura 10. Larvas en estado J2 de NQS parasitados por los diferentes aislados de hongos antagonicos. a) Larva no parasitada b) larva con presencia de micelio con micelio fúngico de aislado TN9P y presencia de conidias; c) larva con micelio fúngico de aislado TN9C; d) larva con micelio fúngico de aislado TN10A; e) larva con micelio fúngico de aislado TN10B; f) micelio de aislado TRO emergiendo por la apertura anal de una larva de NQS. 33
- Figura 12. Aislado de *T. harzianum* (TRO). (a y b) observado macroscópicamente, (c) hifas y conidias observadas microscópica con aumento de 40X y (d) quiste de NQS con micelio fúngico bajo aumento de 10X. 38

Figura 13. Aislado de <i>P. lilacinus</i> TN9C. (a y b) observado macroscópicamente, (c) hifas y conidias observados microscópica con aumento de 40X y (d) quiste de NQS con micelio fúngico bajo aumento de 10X.	38
Figura 14. Aislados de <i>P. lilacinus</i> TN10B. (a y b) observados macroscópicamente, (c) hifas y conidias observados microscópica con aumento de 40X y (d) quiste de NQS con micelio fúngico bajo aumento de 10X.	39
Figura 15. Aislado de <i>P. lilacinus</i> TN9P (a y b) observados macroscópicamente, (c) hifas y conidias observados microscópica con aumento de 40X y (d) quiste de NQS con micelio fúngico bajo aumento de 10X.	39
Figura 16. Aislados de <i>P. lilacinus</i> TN10A. (a y b) observados macroscópicamente, (c) hifas y conidias observados microscópica con aumento de 40X y (d) quiste de NQS con micelio fúngico bajo aumento de 10X.	40

1. INTRODUCCIÓN

La soya, *Glycine max (L) Merr*, es una leguminosa que se cultiva en gran escala por su alto contenido de proteínas. Las semillas de soya se consideran una materia prima de excelente calidad para la extracción de aceites y la manufactura de otros productos alimenticios. Actualmente, Estados Unidos es el mayor productor y exportador de soya a nivel mundial, seguido por Brasil y Argentina, países para los que se estima una producción de soya para el año 2013-2014 aproximada de 41.2, 39.4 y 10.9 millones de toneladas, respectivamente, según el Servicio de Investigación Económica del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA 2013). Estos valores se deben en gran parte a la estrategia de establecer viveros de invierno fuera de los Estados Unidos por parte de varias compañías de semilla.

En Puerto Rico existen nueve empresas productoras de semilla, algunas de ellas establecidas hace poco más de 35 años. Casas comerciales como: Monsanto, Pioneer, Ag Reliant Genetics, Syngenta, Mycogen, Tercer Milenio e Illinois Crops suman una superficie sembrada de soya de 2,000 hectáreas aproximadamente en la isla. El cultivo de soya se ve afectado por la acción de plagas y microorganismos fitopatógenos como; hongos, bacterias, nematodos e insectos que provocan pérdidas en los rendimientos y afectan la calidad de las cosechas. Entre las poblaciones de nematodos fitoparasíticos, *Heterodera glycines* es el de mayor importancia económica para la soya. Este nematodo es comúnmente conocido como el “Nematodo quiste de la soya” (NQS) o Soybean Cyst Nematode (SCN). Es una especie de rápida propagación en los agro-ecosistemas, por lo que se considera una de las plagas más perjudiciales del cultivo. Se estima que las pérdidas pudieran fluctuar entre un 5 hasta un 100% en los rendimientos de las cosechas (Donald et al., 2006). El NQS está presente en la mayoría de las regiones donde se cultiva la soya (Oyekanmi, 2010) y puede sobrevivir en hospederos

alternos de la familia Fabaceae como lo son *Phaseolus vulgaris* y *Cajanus cajan* (Smith y Chavarría, 2003). Estos cultivos son considerados importantes en la cultura y la economía de Puerto Rico.

Los síntomas que advierten la presencia de NQS se observan en las raíces, desde una ligera decoloración hasta una necrosis severa. El diagnóstico se hace al observar la presencia de quistes o hembras blancas o de color crema asociadas a la raíces. En el follaje, los síntomas son poco evidentes, pero cuando ocurren se pueden observar desde un leve a severo retraso del crecimiento vegetal acompañado de clorosis. Su parasitismo es considerado sedentario ya que invade la raíz internamente y se establece permanentemente entre el periciclo y la endodermis de la raíz. La presencia de NQS en la raíz redirige las funciones de las células satisfaciendo sus necesidades nutricionales, de desarrollo y reproducción (Kim et al., 2010). Su alta tasa de reproducción hace de este organismo un problema en el cultivo, ya que cada quiste puede contener de 50 a 400 huevos (Opperman and Bird, 1998). Otras características que agudizan el problema es la capacidad que presentan los quistes para sobrevivir durante largos periodos en el suelo bajo condiciones adversas. Esta estructura de supervivencia combinada con sus métodos de diseminación en agua, suelo, semillas y material infectado lo convierte en un serio problema para los productores de soya (Niblack, 2005).

El primer reporte del NQS atacando la soya se registró en Japón en 1915 y a la fecha ya se ha detectado en Asia, Norte América, Suramérica e Italia. En Puerto Rico se informó su presencia por Smith y Chavarría (1999). Esta noticia es causa de preocupación entre las compañías semilleras de la isla, ya que con su detección la producción de soya se ve amenazada y pudiera reducirse notablemente.

Actualmente la presencia de NQS se maneja mediante medidas culturales como la rotación de cultivos y la utilización de variedades resistentes. Sin embargo, ninguna de ellas es 100% eficiente. A pesar de los esfuerzos, aún no se ha

encontrado genes de resistencia que demuestren ser estables y duraderos en el tiempo. Como consecuencia del desarrollo de variedades resistentes o mejoradas han surgido varias razas de NQS adaptadas a las nuevas variedades (Zheng y Chen, 2011). Con el objetivo de integrar otras alternativas en el manejo y control del NQS se propone realizar una búsqueda de cepas endémicas de hongos con características promisorias para el control del NQS. Para ello se realizarán muestreos en cuatro diferentes áreas de Puerto Rico, tres zonas de reserva forestal y una zona agrícola cultivada con soya, para determinar la presencia de cepas endémicas de *Paecilomyces lilacinus* y *Trichoderma harzianum*, quienes la literatura las consideran potencialmente efectivas como controladores biológicos. Estas cepas producen enzimas quitinolíticas que degradan la quitina, compuesto fundamental de los huevos de los nematodos fitoparasíticos. Actualmente, se encuentran disponibles en el mercado productos para el control biológico de nematodos fitoparasíticos constituidos por hongos como: *Paecilomyces lilacinus* y la bacteria *Pausteria penetrans*. Entre las casa comerciales que producen y distribuyen estos productos están Prophyta GmbH, Malchow, Sudáfrica (Sikora et al., 2005) y Syngenta® USA. Cabe señalar que los agentes de control biológico endémicos actúan mejor sobre las plagas, ya que están adaptados a las condiciones medioambientales de la región y pueden responder de manera más eficiente sobre su control (Gallardo et al., 2009).

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. La soya *Glycine max*

La soya, *Glycine max* L. Merrill, oriunda del sureste de Asia pertenece a la familia Fabaceae. Se cultiva por el valor comercial ya que sus semillas poseen un alto contenido de aceite y proteína. Además, es materia prima para la producción de harinas y aceites, productos que son útiles para la alimentación humana y animal. Por ser una leguminosa, es un cultivo de gran importancia cuando se utiliza como cultivo de rotación estacional, ya que ejerce una actividad simbiótica con bacterias fijadoras de nitrógeno en el suelo.

Las plantas de soya pueden crecer desde 20 cm hasta 2 m de altura, sus tallos y vainas son pubescentes, sus hojas son trifoliadas y las flores se desarrollan en las axilas de la hoja. El color de las flores puede variar de rosa, blanco o púrpura. Sus frutos son en forma de vaina pilosa que crece en grupos de 3 a 5, de 3 a 8 cm de longitud, cada una con 3 a 8 semillas de colores que van desde negro, marrón, azul, amarillo o verde. El hilum puede ser de color negro, marrón, gris y amarillo. Estas semillas contienen un 40% de proteína y 20% de aceite de su peso seco, el resto se compone de 35% de carbohidratos y aproximadamente 5% de ceniza. Es un alimento rico en proteína, muchos de los productos a base de harina de soya se consumen como substitutos de productos cárnicos, ya que su proteína es casi equiparable a la de la carne. Los principales carbohidratos solubles de soya son la sacarosa, rafinosa y estaquiosa. La soya puede capturar del suelo todo el nitrógeno que necesita porque es capaz de desarrollar una relación simbiótica con bacterias fijadoras del nitrógeno atmosférico (Kumudini, 2010).

2.2. Importancia del cultivo de soya

La soya es una semilla de gran importancia comercial por ser ricas en proteínas y lograr la mayor producción bruta de aceite vegetal entre las plantas cultivadas en el mundo. Esta semilla es fuente importante de fitoquímicos y compuestos que proporcionan beneficios a la salud y nutrición humana. Estas características han impulsado el uso y estudio de esta planta en la industria farmacéutica (FAO, 2009).

La producción y utilización de la soya se ve promovida por el amplio rango de adaptabilidad geográfica, por el potencial que tiene sus semillas y derivados para la alimentación humana y animal. Además, su cultivo mejora las características de los suelos, gracias a la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico y la producción de raíces profundas.

2.2.1. Problemas fitosanitarios del cultivo de soya

La soya es originaria de China, es la semilla oleaginosa más importante a nivel mundial. Su producción está concentrada en pocos países, los tres mayores productores son los Estados Unidos, Brasil y Argentina, los cuales cubren el 80% de la producción mundial de soya con una participación aproximada para el 2013 de 33% para los Estados Unidos, un 29% para Brasil y un 19% para Argentina (USDA 2013). El cultivo de la soya durante su desarrollo puede ser afectado por más de 300 especies patógenas en todo el mundo. Estos patógenos son responsables de causar daños económicos significativos con excepción de algunas especies (Mishra, 2010). Entre los agentes parásitos responsables de causar enfermedades económicamente importantes, están las bacterias, hongos, nematodos y virus. Las condiciones ambientales o nutricionales desfavorables también son importantes y pueden ocasionar trastornos en las plantas de soya. Para los años 2001 y 2003, la pérdida mundial estimada en este cultivo fue de 23%; un 11% debido a la presencia de bacterias y hongos parásitos en la siembras, un 1% a los virus y el 11% restante

a plagas, incluyendo nematodos parásitos de plantas (Oerke, 2006). Sin embargo, el grado de daño económico depende del tipo de agente patógeno, el tejido afectado, la cantidad de plantas afectadas, la severidad de la enfermedad, las condiciones ambientales, la susceptibilidad de la planta hospedera, los niveles de estrés de la planta y la etapa de desarrollo del cultivo (Oyekanmi et al., 2010). Al inicio del ciclo de vida, la soya se puede ver afectada por hongos tales como *Phomopsis longicolla*, *Rhizoctonia solani* y oomicetos del género *Pythium* spp. y *Phytophthora* spp. En su etapa de maduración la planta puede ser atacada por la bacteria, *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, el virus del moteado de la vaina, el virus del mosaico de la soya y el hongo, *Sclerotinia sclerotiorum*. En su última etapa del ciclo, la soya puede verse afectada por los hongos: *Cercospora sojina*, *C. kikuchii*, *Phakopsora pachyrhizi*, *Diaporthe* spp., *Phomopsis* spp., *Fusarium virguliforme*, *Colletotrichum* spp. y *Macrophomina phaseolina*. Sin embargo, el agente fitoparásito de mayor importancia económica para este cultivo lo es el nematodo, *Heterodera glycines* (Sikora et al., 2005).

2.3. *Heterodera glycines*

El nematodo de quiste de la soya *H. glycines* es la plaga más dañina de este cultivo, ya que su presencia puede ocasionar hasta un 100% de pérdidas en rendimiento de cosechas (Hartman et al., 2010). El nivel de pérdidas dependerá del tipo de suelo y la densidad poblacional del nematodo. Una sola hembra del NQS produce en promedio de 50 a 400 huevos (Opperman and Bird, 1998). El ciclo de vida de este nematodo es relativamente corto de aproximadamente 30 días en condiciones óptimas de humedad, temperatura y presencia del cultivo (Oyekanmi et al., 2010). Según este autor, los quistes pueden permanecer viables por más de 10 años. Una vez esté presente en el campo su erradicación es imposible. Los daños directos en las plantas se concentran en el sistema radicular obstruyendo la absorción y el transporte de agua y nutrientes. El ataque de NQS en el cultivo produce amarillamiento del área foliar y un retraso en el crecimiento y madurez de

la planta (Hartman et al., 2010). En el campo el daño se observa con un patrón en círculos irregulares, conocidos como parchos. A menudo, los síntomas se confunden con deficiencias nutricionales, exceso o escasez de agua, aplicación errónea de herbicidas o la compactación del suelo. Se observa además una disminución de nodulación por *Rhizobium sp.* en las raíces. El signo más evidente es la presencia de hembras adultas enquistadas en la raíz.

El ciclo de vida del NQS inicia con la eclosión de los juveniles del quiste y su liberación en el suelo donde se orientan estimulados por los exudados de las raíces de la planta de soya. Los juveniles son atraídos por estos compuestos, se mueven hacia la raíz y la penetran. Una vez dentro del tejido vegetal, estos migran en busca de un punto de alimentación, donde se establecen hasta que ocurre la diferenciación de sexos. Las hembras siguen en su sitio de alimentación, mientras que los machos salen de la raíz en búsqueda de las hembras para aparearse. Las hembras siguen creciendo y produciendo huevos, a medida que la hembra se hincha rompe la superficie de la raíz quedando parte de su cuerpo expuesto al suelo. A medida que produce huevos se mantiene alimentándose de la raíz hasta envejecer. El quiste puede variar en coloración, dependiendo de sus estado de desarrollo, siendo de color blanco o crema cuando los huevos no han madurado, pero a medida que se desarrollan los huevos y larvas su coloración cambia a marrón debido a la deposición de melanina (Oyekanmi et al., 2010).

2.3.1. Medidas de control o manejo del problema

Actualmente, el problema de NQS en los cultivos de soya se maneja con medidas culturales como la rotación de cultivos con plantas no hospederas, control sanitario en el material de propagación, uso de semilla certificada libres de partículas de suelo, higiene de los equipos utilizados en campo (maquinaria, calzado de trabajadores, etc.), restricción en el movimiento de suelo y uso de variedades resistentes. Esta última política de manejo (variedades mejoradas

genéticamente) no ha mostrado ser del todo eficiente, ya que el nematodo ha desarrollado la habilidad de adaptarse a las nuevas variedades provocando el surgimiento de nuevas razas (Zheng and Chen, 2011).

En las décadas pasadas se utilizó para el combate de nematodos fitoparásitos productos a base de dibromocloropropano (DBCP) como ingrediente activo, el cual fue prohibido en la década de 1980 por producir efectos negativos en la salud humana. Actualmente, se utilizan nematicidas no fumigantes que pertenecen a dos grupos de químicos: carbamatos y organofosforados (Chavarria et al., 2005). Ambos grupos de nematicidas causan el riesgo de que sean retirados del mercado por su efecto nocivo a la salud y el ambiente. Es por ello que surge la necesidad de encontrar alternativas para el control de nematodos fitoparasíticos que resulten de bajo impacto para el ambiente. La ciencia se ha enfocado en crear programas de manejo integrado donde los productos biológicos sustituyen los productos químicos pero cumpliendo con el principio de una agricultura sostenible.

2.4. Control biológico

El control biológico se basa en la manipulación intencional de las poblaciones de los enemigos naturales de la plaga con el fin de reducir el daño ocasionado por ésta. A estos organismos se les llama agentes de biocontrol y entre ellos se encuentran insectos depredadores y parasitoides, así como microorganismos patógenos de la plaga (Prior, 1992). El éxito de esta práctica depende del conocimiento que se tenga de la biología, fisiología y genética del agente, así como el ambiente donde actúan y de la interacción con los hospederos o presas (Hokkanen y Pimentel, 1984; Prior, 1992). El control biológico se caracteriza por ser inócuo al ser humano, los animales y el medio ambiente. Estas características son de gran importancia en el momento de buscar alternativas que puedan ser implementadas en programas de manejo integrado de plagas, con el fin de minimizar el uso de productos químicos que resultan peligrosos al ser humano y

generan un impacto negativo al medio ambiente. El manejo biológico es un componente esencial, tanto en el control integrado de plagas como en la agricultura ecológica sostenible.

2.4.1. Microorganismos antagónicos de nematodos

Paecilomyces lilacinus (Thom, 1910) Samson, pertenece al reino Micota, clase: Ascomycetes, el orden Eurotiales y a la familia Trichocomaceae según Bainier en 1907. Se aisló por primera vez en Perú en huevos de *Meloidogyne* sp. Es un hongo que afecta tanto a nematodos filiformes como a hembras sedentarias, pero es más agresivo parasitando huevos. Este hongo destruye los ovarios de las hembras, disminuye la eclosión de los huevos y produce toxinas que afectan el sistema nervioso de los nematodos (Piedra, 2008). Esta especie presenta un rápido crecimiento en el suelo, los conidióforos tienen longitud aproximada de 600 μm y sus conidias son elipsoides de color lila, con longitud de 2.5 a 3 μm y 2 a 2.2 μm de ancho y producidas en cadena (Barnett et al., 1998; Piedra, 2008; Bhat et al., 2009).

Diversas investigaciones enfocadas a realizar catastros de hongos relacionados con nematodos fitoparasíticos y a evaluar su actividad parasítica sobre huevos y hembras de diferentes especies de nematodos como, *Nacobus aberrans*, *Tylenchulus semipenetrans*, *Globodera* sp., *Meloidogyne* sp y *Heterodera* sp., han demostrado la eficiencia de *P.lilacinus* para reducir sus poblaciones. La efectividad de este hongo para parasitar huevos y destruir las larvas de los nematodos depende de la capacidad de penetración. Además se ha demostrado que este hongo puede causar deformación de huevos y estimular la eclosión prematura, su proceso de parasitismo comienza con la germinación y desarrollo de las hifas sobre la matriz gelatinosa que contiene los huevos, posteriormente estas hifas penetran el cascaron de los huevos por medio de pequeños poros que estos presentan y una vez dentro, el micelio sigue creciendo hasta parasitar al embrión desintegrando su cutícula (Davila, 1990).

Las especies de *Trichoderma* sp. son hongos cosmopolitas del suelo y pueden aislarse en medios de cultivo sintéticos. Actualmente, la mayoría de las especies de este género se han descrito en Norteamérica y Europa. Es un hongo que presenta rápido crecimiento y alta tasa de producción de esporas, características deseables para un buen controlador biológico (Romero-Arenas et al., 2009). Estudios realizados demuestran su asociación con las raíces de las plantas y su acción antagonista de patógenos mediante la inducción de resistencia en la planta y el ataque directo sobre los patógenos (Harman, 2006 y Harman et al., 2008). En 1990, Meyer y colaboradores registraron la presencia de *Trichoderma* sp. afectando el NQS en campos de soya de los Estados Unidos y el efecto antagónico de este hongo sobre huevos del nematodo. Estos autores observaron que la virulencia del hongo sobre los nematodos variaba dependiendo del aislado. El género *Trichoderma* fue el primer aislado fúngico en ser el primer aislado fúngico en ser recuperado a partir de muestras de suelo y es uno de los microorganismos antagónicos mejor estudiado a nivel mundial para usarse en programas de control de microorganismos patógenos a plantas. A pesar de ser un parasito por excelencia es posible aislarlo a partir de muestras de suelo, esto se explica por su capacidad saprofítica. Infante y colaboradores (2009), describen como los hongos saprofiticos pueden sobrevivir en los residuos de materia orgánica de los suelos, utilizándola para obtener el carbono necesario y sobrevivir hasta tener a su alcance un huésped. Además de ser un hongo saprofito facultativo, es un microorganismo que puede tolerar condiciones extremas del ambiente por lo que podemos encontrar diferentes especies de este hongo en diversas latitudes como las zonas polares y la zona tropical (Infante et al., 2009). Además de las características antagónicas y de micoparásito que presenta este hongo, también se ha observado que su aplicación estimula el crecimiento y floración de las plantas. Esto se puede atribuir al control de fitopatógenos que se encuentren en la rizosfera de las plantas tratadas, a la producción de hormonas, producción de vitaminas y la conversión de nutrientes como zinc, magnesio y potasio que son transformados por el hongo hasta una forma asimilable para la planta (Chang et al, 1986).

Los géneros *Trichoderma* y *Paecilomyces* encontrados en este estudio son hongos imperfectos donde se agrupan la mayoría de las especies utilizadas en programas de manejo integrado de plagas por las características antagónicas que estos presentan (Araujo et al., 2009). Diversos aislados de estos hongos pueden producir epizootias en poblaciones de plagas gracias a su modo de acción, ya que las conidias de éstos hongos actúan por contacto directo a través de la cutícula de los insectos y nematodos, germinando y colonizando la superficie de éstos, la cual es degradada y utilizada como fuente de alimento (López y Scorsetti, 2007; Cardona y Leguizamon, 1997). Microscópicamente estas estructuras fúngicas se observaron cubriendo parcialmente algunos huevos y larvas de NQS después de 96 horas de exposición a los diferentes tratamientos con los aislados de *P. lilacinus* y *T. harzianum*. Además de las quitinasas, se ha demostrado que estos hongos producen enzimas líticas extracelulares como glucanas, proteasas y otros metabolitos como celulasas, glucasas, lipasas que le permiten degradar las membranas celulares de organismos patógenos y plagas, facilitando así la penetración e inserción de estructuras especializadas y promover su capacidad parasítica.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Determinar la presencia de aislados de *P. lilacinus* y *T. harzianum* en muestras de suelo procedentes de tres zonas de reserva forestal de Puerto Rico y un área agrícola cultivada con soya.

3.2. Objetivos específicos

1. Aislar, purificar y conservar los hongos *P. lilacinus* y *T. harzianum* con características promisorias para ser utilizados como método de control biológico de *H. glycines*.
2. Efectuar pruebas de parasitismo con los hongos *P. lilacinus* y *T. harzianum* sobre *H. glycines* en condiciones de laboratorio e invernadero.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Fase de campo

4.1.1. Toma de muestras en zonas de reserva forestal

Se tomaron cinco muestras al azar en cada una de las 3 zonas de reserva forestal de Puerto Rico: Bosque estatal Toro Negro (segmento ubicado en el municipio de Jayuya), Bosque Estatal de Monte Guilarte (segmento ubicado en el municipio de Adjuntas) y el Bosque Estatal de Rio Abajo (segmento ubicado en el municipio de Utuado) (Figura 1). En cada zona se realizó un muestreo sistémico, tomando la primera muestra en un punto al azar en el bosque a 10 m de la carretera y las muestras restantes se tomaron a 10 m del primer punto muestreado. De cada lugar muestreado se registraron las coordenadas con un sistema de posicionamiento geográfico GPS (Global Position System). Cada muestra estuvo constituida por 5 submuestras de aproximadamente 100 g, para un total de 500 g de suelo por muestra. Este suelo se tomó de los primeros 20 cm de profundidad, eliminando los primeros 5 cm de la muestra. Se realizaron dos muestreos, uno durante la temporada seca (el 21 de octubre de 2011), y otro durante la temporada de lluvias (el 3 de julio de 2012).

Cada una de las muestras se empacó en bolsas plásticas debidamente marcadas con la fecha, lugar y colector. Estas se manejaron de manera que los rayos directos del sol y la temperatura no las afectaran. En el laboratorio se almacenaron a 4° C hasta ser procesadas.



Figura 1. Zonas muestreadas: (1) Bosque Estatal de Toro Negro, (2) Bosque Estatal de Monte Guilarte, (3) Bosque Estatal de Río Abajo y (4) Cultivo de soya en el municipio de Isabela.

4.1.2. Toma de muestras en área agrícola cultivada con soya

Con el objetivo de encontrar esporas de hongos antagonistas a nematodos en la rizosfera de plantas de soya, se realizaron dos muestreos de tipo sistémico en campos cultivados con soya infestados con NQS, en el municipio de Isabela (febrero 10 y septiembre 16 de 2011). Se tomaron 10 muestras a partir de una planta de soya elegida al azar a 1 m del borde de la hilera del cultivo, a partir del cual se siguió un patrón en zig zag, muestreando en la rizosfera de las plantas cada 10 m (Figura 2). Cada muestra estuvo constituida por 5 submuestras de aproximadamente 100 g (total 500 g de suelo). Se efectuó el mismo protocolo descrito anteriormente en el muestreo de las zonas de reserva forestal, para el manejo de las muestras hasta llegar al laboratorio de Nematología de la Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez.

el número de muestra y la dilución correspondiente. De cada dilución de suelo se tomó una alícuota de 100 μ L y se inoculó en placas Petri con 20 mL de medio de cultivo Agar Ohio y Rosa de Bengala (Apéndice 1) con tres replicas por dilución. En adicción, de cada una de las cinco diluciones de las muestras de suelo procedentes del Bosque estatal Toro Negro, se tomó una alícuota de 100 μ L y se inoculó en placas Petri con 20 mL de medio de cultivo selectivo usado por Turner y colaboradores (1991) para aislar *Bacillus subtilis* V8 (Apéndice 1)

Medio V8 (400 mL de jugo V8, 40 g de NaCl, 1 g de dextrosa, 20 g de Agar, 600 mL de agua de grifo y el pH ajustado a 5.2 antes de autoclavar). Las placas se incubaron a $25 \pm 2^\circ$ C por 14 días, y se realizaron observaciones periódicas cada 24 horas, para describir el desarrollo de cada aislado. Aquellas colonias con características similares a las de *P. lilacinus* y *T. harzianum* fueron consideradas para realizar las pruebas de antagonismo. Además se observaron bajo microscopio y se identificaron utilizando claves taxonómicas especializadas. Posteriormente se re-aislaron en cultivos puros con medio de cultivo PDA modificado por recomendación de la Tecnóloga encargada del cepario de hongos entomopatogenos del CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) Rosalba Tobón (PDA 39g/L, extracto de levadura 4,5g/L, peptona 4,5g/L, 4,5g/L quitina y ácido láctico al 25% adicionado al 1% del volumen a preparar) a $25 \pm 2^\circ$ C y se conservaron a 4° C (García et al., 2012).

4.3. Pruebas de Antagonismo

4.3.1. Extracción de quistes

Las pruebas de antagonismo se realizaron con quistes de *H. glycines* recuperados de plantas de soya cultivadas en suelo procedente de una zona agrícola con presencia de esta plaga. Para la recuperación de los quistes se siguió un método establecido en el Laboratorio de Nematología de la Universidad de Puerto Rico Recinto de Mayagüez basado en el principio de la flotabilidad de los

quistes y el método de extracción por tamizado. Para ello se tomaron 100 g de cada muestra de suelo de la rizosfera de las plantas de soya, las cuales se homogenizaron y se dejaron secar durante 2 a 3 días bajo condiciones de laboratorio. Posteriormente, cada muestra se mezcló con 3 L de agua en recipientes con capacidad para 10 L y se agitaron con la ayuda de un taladro con aspás durante 30 segundos. Después se dejó reposar por 1 minuto y se vertió lentamente $\frac{3}{4}$ partes de la mezcla por los tamices de tamaño # 20 y # 60 sobrepuestos (el tamiz # 20 en la parte superior). La malla del tamiz # 60 filtró las hembras enquistadas de *H. glycines* y algunas partículas de suelo, por lo que se lavaron con abundante agua y se guardaron en placas Petri debidamente rotuladas a 4° C para ser usadas en las siguientes 12 horas. Todos los materiales se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 5% y abundante agua después de procesar cada muestra de suelo. Venticuatro horas después se extrajeron los quistes de forma manual con una pinza entomológica de punta fina (BIOquip) bajo un estereoscopio (Olympus optical, Model 52X-ILLD100). Los quistes extraídos se depositaron en viales de 10 mL de capacidad debidamente rotulados y se almacenaron a 4° C.

4.3.2. Fijación de quistes y huevos de *Heterodera glycines* en alginato

Para estudiar el efecto antagonista de los hongos sobre el nematodo de quiste de la soya se realizaron pruebas con láminas de alginato (Rodríguez-Kábana, 1994). Se extrajeron quistes viables y se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 5% durante 30 segundos, posteriormente se enjuagaron con ADE y se eliminó el exceso de agua con papel filtro previamente esterilizado. Los quistes se fijaron con alginato al 3% en una rejilla de polietileno y fibra de vidrio con apertura de malla de 1 mm y con dimensiones de 20 x 40mm. Para ello se preparó una mezcla de 3 g de alginato y 100 mL de ADE y se agitó en una licuadora (Waring Commercial, model 51 BL32) por 30 segundos. La mezcla se calentó por 1 minuto en el microondas a su máxima potencia evitando que el líquido se derramara y se dejó enfriar por 3 a 4

horas o hasta que se eliminaran las burbujas de aire. Al lograr una mezcla uniforme, las rejillas previamente esterilizadas se sumergieron en el alginato durante 30 segundos (aproximadamente) utilizando una pinza de punta fina, se colocaron 10 quistes de NQS en cada rejilla impregnada con la mezcla de alginato e inmediatamente se sumergió cada una en una solución de cloruro de calcio 25M durante 3 minutos para fijar el alginato (Rodríguez-Kábana, 1994). Para la fijación de los huevos y larvas J2 de NQS se utilizaron los huevos y larvas contenidos en 50 quistes previamente desinfectados con hipoclorito de sodio al 5% y se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente para la fijación de quistes con una modificación. La diferencia consistió en mezclar el inóculo (huevos y larvas J2 de NQS) a razón 2:1 (v:v) con la mezcla de alginato sin burbujas de aire. Las rejillas, previamente esterilizadas, se sumergieron en la mezcla de inóculo y alginato durante algunos segundos y se pasaron por dos anillos de cristal para controlar el espesor de la lámina. Posteriormente, cada rejilla se sumergió en una solución de cloruro de calcio 25M por 3 minutos para fijar el alginato (Rodríguez-Kábana, 1994).

4.3.3. Pruebas de antagonismo *in vitro*

Para evaluar la presencia de actividad parasítica de los diferentes aislados fúngicos sobre quistes y huevos de NQS se realizaron cuatro pruebas de antagonismo *in vitro*. La primera prueba se llevó a cabo durante el mes de enero de 2012, en la cual se usaron 200 quistes de NQS y se evaluó la actividad antagónica de tres aislados fúngicos, dos de *P. lilacinus* los cuales fueron nombrados con las iniciales del bosque estatal Toro Negro donde fueron tomadas las muestra de suelo de la cual se aislaron (TN10A y TN10B) y un aislado de *T. harzianum*, la cual lleva las iniciales del género (TRO) ya que fue el único aislado que se encontró durante todos los muestreos. La segunda prueba se realizó durante el mes de agosto de 2012, la tercera y cuarta prueba se realizaron en los meses de febrero y marzo del 2013. En estas últimas tres pruebas se utilizaron huevos y larvas en estado J2 de NQS y se evaluaron cinco aislados de hongos antagonistas.

Durante la primera prueba realizada en el mes de enero de 2012 a nivel de laboratorio se utilizaron 20 rejillas con 10 quistes viables de NQS, éstas se colocaron en frascos de vidrio de 20mL de capacidad con 15 gramos de arena previamente esterilizada. Estos se inocularon con 1mL de dilución de 10^{-1} de cada hongo; un aislado de *T. harzianum* y dos aislados de *P. lilacinus*, de cultivos previamente purificados, para un total de tres tratamientos evaluados: TRO, TN10A y TN10B. El cuarto tratamiento fue el control constituido por Agua Destilada Estéril (ADE). Los tratamientos se incubaron por 8 días a $25 \pm 2^\circ$ C. A los seis días de estar en los frascos que contenían arena y las diluciones de cada aislado, se extrajeron las rejillas y se dispusieron en cámara húmeda por dos días con la adición de un trozo de PDA con quitina de dimensiones 1 cm^3 . Después de este último proceso se realizaron observaciones macroscópicas y microscópicas a cada una de las rejillas para evaluar la presencia o ausencia de micelio sobre los quistes tratados. Los quistes que presentaron micelio sobre su estructura se disectaron y se examinaron los huevos y larvas para verificar parasitismo por parte de los aislados fúngicos usados en cada tratamiento. Los datos de quistes, larvas y huevos parasitados se registraron para posteriormente realizar una prueba de varianza y observar si había o no diferencias significativas entre los tratamientos utilizados.

Durante los meses de agosto de 2012, febrero y marzo del 2013 se realizaron la segunda, tercera y cuarta prueba de actividad antagónica sobre huevos y larvas de NQS. Para éstas se siguió el mismo protocolo descrito anteriormente para evaluar la actividad antagónica de los primeros tres aislado sobre quistes de NQS. A diferencia de la primera prueba, en éstas se utilizaron 30 rejillas con huevos y larvas de NQS, las cuales contenían aproximadamente 298 huevos y un promedio de 26 larvas J2 por rejilla. En esta ocasión, se evaluaron cinco aislados de hongos antagónicos TN10A, TN10B, TN9P, TN9C y TRO, ya que se contó con dos aislados que se obtuvieron en el muestreo realizado en el mes de julio de 2012. En total se evaluaron seis tratamientos; constituidos por cinco aislados fúngicos y un tratamiento control (ADE). Los diferentes tratamientos se

revisaron después de 4 días (96 horas) de incubación, tiempo en el cual las rejillas estuvieron 48 horas entre los frascos con arena y las diluciones de 1 mL de dilución de 10^{-1} de los diferentes aislado de los hongos antagónicos y otras 48 horas en cámara húmeda en la incubadora a $25 \pm 2^\circ$ C. La actividad antagónica se evaluó hasta el séptimo día de exposición. Estudios preliminares indicaron que las láminas de alginato se degradaban luego de los 8 días de exposición.

4.4. Ensayos de invernadero

Las láminas de alginato preparadas con los huevos y larvas de NQS (aproximadamente 290 huevos y 26 larvas en etapa J2 por lamina) se colocaron en tiestos con capacidad para 3.78 L con tres plantas de soya previamente germinadas (8 días). El suelo de los tiestos procedía de una área agrícola con presencia de *H. glycines*. Posteriormente, se inoculó cada tiesto con 5 mL de dilución de esporas de los cuatro aislados de *P. lilacinus* y un aislado de *T. harzianum* en concentraciones aproximadas a 10^7 y 10^8 unidades formadoras de colonias de cada hongo. Además, se tuvo un control con 5 mL de ADE. Se realizaron 12 réplicas por tratamiento los cuales estuvieron bajo condiciones de invernadero ($27 \pm 2^\circ$ C y 85% de humedad relativa) por 30 días siguiendo un diseño completamente aleatorizado (DCA). Pasada 48 horas se extrajeron las rejillas y se enjuagaron superficialmente con agua destilada estéril. Luego se eliminó el exceso de agua de las rejillas con papel kimwipes® estéril. Después, se sometieron a cámaras húmedas estériles, las cuales estaban constituidas por placas Petri que contenían en su interior un disco de papel filtro No. 1 de 110 mm de diámetro y una laminilla porta-objeto. Éstos se humedecieron con 1 mL de agua destilada estéril y la rejilla se depositó sobre la laminilla porta-objetos para evitar que el material de alginato, los huevos y larva hicieran contacto directo con el agua y se pudiera producir una contaminación cruzada con bacterias u otros hongos oportunistas. Después de 48 horas se observaron las rejillas microscópicamente para determinar la actividad antagónica de los hongos sobre los nematodos en los diferentes tratamientos. Las plantas de

soya se mantuvieron durante dos semanas más para después evaluar el efecto de los diferentes tratamientos sobre su desarrollo. Para ello se escogieron al azar 5 plantas de cada tratamiento a las cuales se le pesó y midió la longitud de la raíz principal, posteriormente se sometieron a decoloración para realizar la tinción de los nematodos que hubiesen podido sobrevivir a los tratamientos y parasitar las raíces.

4.5. Tinción de nematodos

Con el fin de confirmar la presencia de nematodos parasitando las raíces, se tomaron las raíces de cinco plantas de soya al azar (las mismas seleccionadas para tomar el peso y longitud), se cosecharon y se les aplicó el método de tinción con Fucsina ácida. Para preparar la solución colorante se dispuso de 200 mL de agua destilada en un beaker con capacidad para 250 mL y se le adicionó 1 mL de ácido acético y 0.201 g de cristales de Fucsina. Las raíces de las plantas se lavaron con agua y se sometieron a un tratamiento de aclarado con hipoclorito de sodio a una concentración de 5% durante 11 minutos, luego se agitaron ocasionalmente, y se enjuagaron con agua por 1 minuto. Se dejaron en un beaker con agua por 15 minutos más para eliminar el exceso de hipoclorito de sodio y se secaron sobre un papel absorbente. Al secarse las raíces, éstas se sumergieron en la solución colorante de Fucsina durante 24 horas y luego se sumergieron en glicerina, acidificada con 15 gotas de 5NHCl, para eliminar el exceso de colorante. Posteriormente, se realizaron observaciones bajo estereoscopio a 10X y se cuantificó la población de nematodos que estaban parasitando las raíces para cada tratamiento.

4.6. Prueba de viabilidad de huevos de *H. glycines*

Para discriminar entre los huevos viables se realizó una prueba con NaOH 1N (Chen y Dickson, 2000). Antes de realizar las pruebas de antagonismo se evaluó la viabilidad de los huevos y quistes a usar. Para ello se escogieron al azar

5 quistes de *H. glycines*, se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 5%, se depositaron en un vidrio de reloj con 5 mL de ADE y se le extrajeron los huevos y larvas, posteriormente se sacó 10 μ L de la mezcla de agua con larvas y huevos y se depositaron sobre una laminilla, se contó el número de huevos y larvas y se observó la posición del cuerpo de las larvas (rectas u onduladas). Posteriormente se adicionó 10 μ L de NaOH 1N a la laminilla con los huevos y larvas. Después de 30 segundos de adicionado el NaOH se observó y discriminó entre huevos y larvas viables, para ello se tomó como criterio el movimiento de las larvas y la eclosión de los huevos al reaccionar con el NaOH 1N. La observación se realizó durante 3 minutos.

4.7. Postulados de Koch

Para comprobar que los quistes y huevos que presentaron signos de micosis fueron parasitados por aislados utilizados en los tratamientos, se extrajeron 3 quistes y 3 fragmentos de laminilla de alginato con huevos de NQS en los cuales se observó presencia de micelio. Este se sembró en placas Petri con PDA modificado con quitina y se incubaron por 14 días a una temperatura de $25 \pm 2^\circ$ C. Después de 48 horas, se realizaron observaciones macroscópicas y microscópicas para garantizar que el agente causal de los síntomas fuesen los hongos estudiados y no un contaminante. Este procedimiento se realizó para todos ensayo.

4.8. Análisis estadístico

Para detectar diferencias significativas entre las diferentes variables se realizó un análisis de varianza ANOVA con el programa estadístico Info Stat-Statistical Software versión 2011e (www.infostat.com.ar). Las diferencias entre tratamientos se realizaron con un nivel de significancia del 5% ($p \leq 0.05$). La diferencia entre medias entre tratamientos se determinó por medio de una prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

5. RESULTADOS

5.1. Muestreo y aislamiento de hongos antagonistas de nemátodos

En las muestras de suelo procedentes de las zonas de reserva forestal se identificaron cuatro aislados de hongos con características antagónicas de nematodos, dos provenían de las muestras colectadas en el bosque estatal de Toro Negro en el municipio de Jayuya durante el primer muestreo realizado en octubre del año 2011 y un tercero y cuarto aislado provenientes de las muestras colectadas en el bosque estatal Bosque Guilarte en el municipio de Adjuntas durante el mes de julio de 2012. En las muestras de suelo procedentes del bosque estatal de Rio Abajo no se encontraron aislados fúngicos con características antagónicas. De las muestras de suelo provenientes de la zona agrícola cultivada con soya del municipio de Isabella se aisló un quinto hongo que presentó las características deseadas. Además, en las placas Petri se identificaron varias colonias de otros hongos de suelo como *Penicillium* sp., *Nigrospora* sp., *Fusarium oxysporum*., *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp., y otros aislados que no pudieron ser identificados. De las colonias fúngicas que crecieron en los diferentes medios selectivos, sólo se seleccionaron las que produjeron un halo de inhibición y un rápido desarrollo, características típicas de hongos antagónicos como *P. lilacinus* y *T. harzianum*., las cuales fueron purificadas en placas Petri con medio de cultivo PDA modificado con quitina. Cuatro de los aislados fueron identificados como *P. lilacinus*, a los cuales se les nombró con los siguientes códigos: TN10A, TN10B, TN9P y TN9C. Los aislados procedían de cuatro puntos geográficos diferentes y presentaron diferencias morfológicas así como distintos patrones de crecimiento en medio de cultivo de PDA (Figura 3). También se identificó el hongo *T. harzianum* al que se le dio el código: TRO (Figura 4). Cada aislado se describió morfológicamente realizando observaciones macroscópicas y microscópicas de las colonias desarrolladas en PDA y se clasificaron usando la clave de Barnett y colaboradores (1998) (Tabla 1).

Tabla 1. Características macroscópicas y microscópicas de los hongos aislados de cuatro puntos geográficos diferentes de Puerto Rico

Género	Aislado	Características macroscópicas	Características microscópicas
<i>P. lilacinus</i>	TN10A	Crecimiento lento de 4 – 5 días a 25±2° C, micelio aéreo abundante blanco de textura afelpada y topografía abombada. Después de seis días el centro se torna rosado y se extiende a medida que crece la colonia, después de 10 días se torna de color lila y al reverso se observa la formación de anillo, tiñe el medio.	Presenta hifas hialinas septadas, producción de conidióforos ramificados, fialides múltiples y alargadas con la base ancha. Las conidias hialinas con forma elíptica y de pared lisa (2.0–2.5 µm) formadas al final de la fialides en cadena (Figura 3a)
<i>P. lilacinus</i>	TN10B	Crecimiento lento de 4 – 5 días a 25±2°C, micelio aéreo bajo de color blanco, textura afelpada, después del 6 días el centro se torna de color lila y se extiende al resto de la colonia. Después de 10 días el reverso se tiñe de color purpura y se observa la formación de anillos.	Presenta hifas hialinas septadas, producción de conidióforos ramificados, fialides en pares, múltiples y alargadas con la base ancha. Las conidias son hialinas con forma elíptica y de pared lisa (2.0–2.5µm) formadas al final de la fialides en cadena (Figura 3b)
<i>P. lilacinus</i>	TN9P	Crecimiento lento de 6 - 7 días a 25±2°C, micelio aéreo bajo y compacto con apariencia de polvo, anverso de color lila claro con bordes blancos, crecimiento concéntrico, en el anverso se observa formación de anillos de color marrón.	Presenta hifas hialinas septadas, producción de conidióforos ramificados, fialides múltiples y alargadas de base ancha. Las conidias hialinas con forma elíptica y de pared lisa (2.0–2.5 µm) formadas al final de la fialides en cadenas (Figura 3c).
<i>P. lilacinus</i>	TN9C	Desarrollo lento de 4 - 5 días a 25±2° C, micelio aéreo bajo blanco, de textura afelpada con crecimiento concéntrico. Después de 10 días el micelio adquiere coloración lila tenue con el centro y bordes blancos, al anverso se observa formación de anillos, no tiñe el medio.	Presenta hifas hialinas septadas, producción de conidióforos ramificados, fialides múltiples y alargadas con la base ancha. Las conidias hialinas con forma elíptica y de pared lisa (2.0–2.5 µm) organizadas en cadena al final de la fialides (Figura 3d).
<i>T. harzianum.</i>	TRO	Colonias de rápido crecimiento en PDA, 7-9 cm diámetro después de 3 días, micelio aéreo abundante, blanco y después cambia la tonalidad a verde o gris cuando el micelio cubre toda la placa, presenta apariencia polvorienta. El micelio tiñe el medio, presenta colonias amarillas, pardas, ocráceas (Figura 4a)	Hifas hialinas con conidióforos ramificados y fialides simples o en grupo. Produce conidias hialinas unicelulares de forma ovoide que se producen en pequeños racimos terminales de rápido crecimiento y de color verde, con producción de muchas clamidosporas, solitarias, sub-hialinas a amarillo pálido, con la edad, elipsoidales o piriformes (2.–2.5 µm) (Figura 4b).

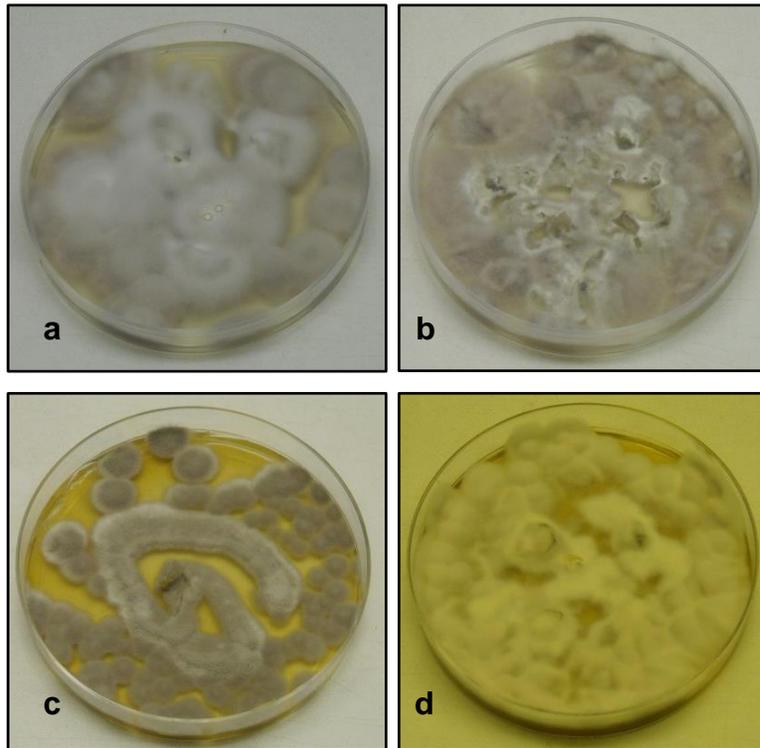


Figura 3. *P. lilacinus*. (a) Aislado TN10A colonia con 12 días de desarrollo en PDA; (b) Aislado TN10B colonia con 12 días de desarrollo en PDA; (c) aislado TN9P colonia con 12 días de desarrollo en PDA; (d) aislado TN9C colonia con 12 días de desarrollo en PDA.

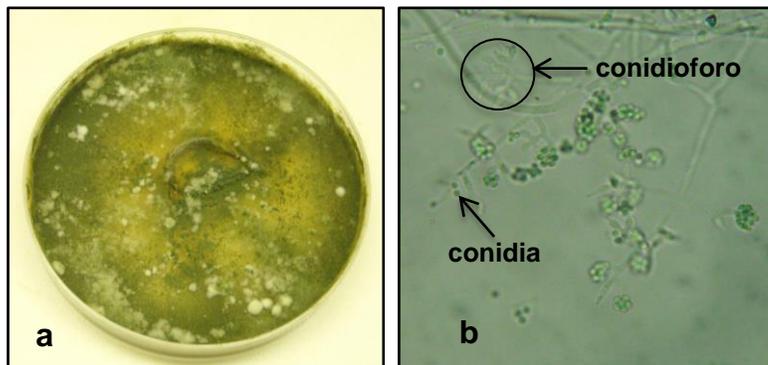


Figura 4. *Trichoderma harzianum*. (a) colonia con 12 días de desarrollo en PDA; (b) conidióforo y conidias observadas a 40X de aumento.

Los diferentes aislados fueron purificados y conservados en medio de cultivo de PDA modificado con quitina en los cuales se observó un mejor crecimiento comparada con su desarrollo en medio de PDA (Figura 5).

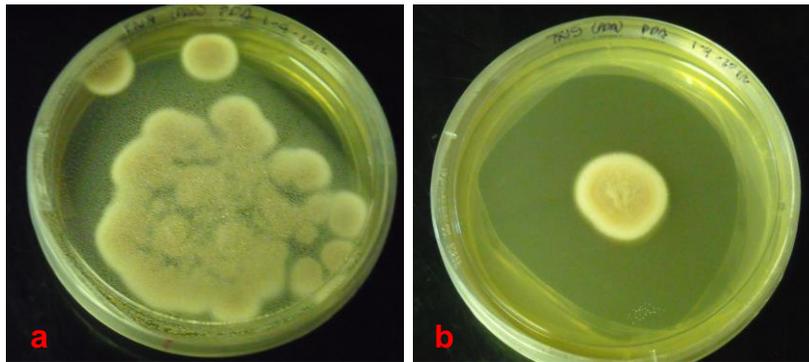


Figura 5. Crecimiento micelial del aislado TN 9P de *P. lilacinus* después de ocho días de inoculado en medio PDA y PDA con quitina. (a) Crecimiento en medio PDA con quitina y (b) Crecimiento micelial en medio PDA sin quitina. Se observa que los aislados sembrados en el medio de cultivo modificado presentaron un mejor desarrollo.

5.2. Actividad antagónica in vitro

En las pruebas de antagonismo realizadas durante enero de 2012 con los aislados TN10A y TN10B de *P. lilacinus* después de 8 días se observó el desarrollo de una estructura color lila sobre algunos quistes de NQS (Figura 6a). Al disectar los quistes y revisar bajo microscopio los huevos contenidos en el interior se observó la presencia de tejido micelial rodeando algunos huevos (Figura 6b). Caso contrario ocurrió con el tratamiento control, en el cual no se observó crecimiento micelial sobre quistes ni sobre huevos de NQS (Figura 7).



Figura 6. *P. lilacinus* parasitando quistes y huevos de NQS. (a) quiste de NQS con presencia de micelio de color lila en la parte inferior observado a 10X de aumento; (b) huevo traslucido de NQS con presencia de micelio sobre su cubierta, observado a 40X.

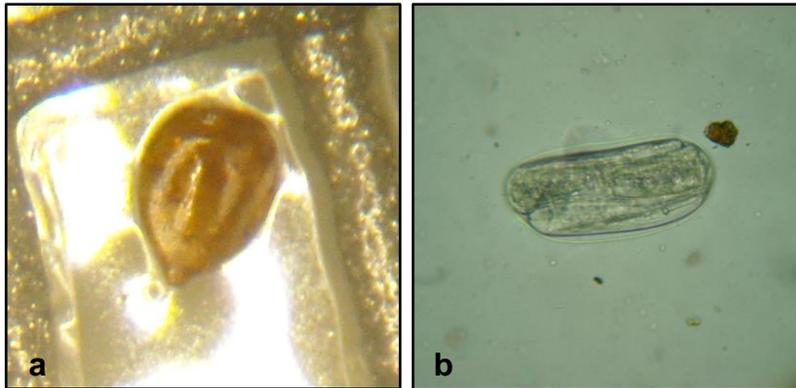


Figura 7. Quistes y huevos de NQS. (a) quiste de NQS sin presencia de micelio en la superficie observado a 10X de aumento; (b) huevo traslucido de NQS sin presencia de micelio sobre su cubierta, observado a 40X.

Los resultados obtenidos en las pruebas con el aislado TRO de *T. harzianum* también mostraron desarrollo de tejido de color inicialmente verde oliva y textura polvosa cubriendo la totalidad de algunos de los quistes que se trataron con este hongo (Figura 8a). Al disectar los quistes y extraer los huevos, algunos se observaron con un tejido filamentososo que los cubría parcialmente y con presencia de pequeñas esferas de color verde que se identificaron como conidias (Figura 8b).

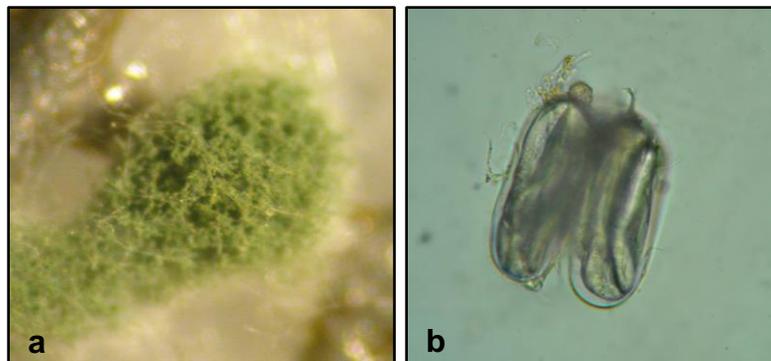


Figura 8. *T. harzianum* parasitando quistes y huevos de NQS. (a) quiste de NQS con presencia de micelio de color verde oliva cubriendo toda la superficie de la estructura quística observado a 10X de aumento; (b) Dos huevos traslucidos de NQS con presencia de micelio sobre su cubierta, observado a 40X.

En este experimento de laboratorio sólo se evaluó la actividad antagónica de los tres aislados fúngicos que se habían logrado aislar en el muestreo realizado durante el mes de octubre de 2011 (dos aislados de *P. lilacinus* y un aislado de *T. harzianum*). Después de 8 días de inoculadas las láminas de alginato con los diferentes tratamientos se determinó la presencia de micelio sobre los quistes de

NQS. Se observó que los tres aislados parasitaron los quistes de NQS (Tabla 2). Al examinar el contenido de cada quiste parasitado por los aislados, se encontró que algunos huevos fueron colonizados por micelio. Los análisis estadísticos mostraron diferencias en el número promedio de huevos parasitados por dichos aislados (Tabla 3). Caso contrario ocurrió con los quistes y huevos inoculados con ADE donde no se observó parasitismo.

Tabla 2. Quistes de NQS parasitados por aislados de hongos antagonistas en el mes de enero 2012.

Tratamientos	Quistes parasitados *
TN10A	2.40 a
TN10B	1.60 a
TRO	2.00 a
Control	0.0 b
DMS	1.46

*Medias con la misma letra en cada columna no difieren significativamente entre si según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$)

Al analizar los datos de la cantidad de huevos parasitados que se encontraron en el interior de los quistes parasitados, los resultados de la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) muestran que hubo diferencias significativas sólo entre los tratamientos con los aislados de *P. lilacinus* y el control (Tabla 3). Caso contrario ocurrió con las larvas en estado J2 (Tabla 4). En general se observó que de un promedio de 23 larvas J2 que se encontraron por quiste, solo una o dos fueron encontradas con presencia de micelio fúngico sobre su cutícula.

Tabla 3. Huevos parasitados por aislados de hongos antagonistas durante enero de 2012 bajo condiciones de laboratorio.

Tratamientos	Huevos parasitados*
TN10A	41.80 a
TN10B	31.20 a
TRO	9.40 b
Control	0.0 b
DMS	13.59

*Medias con la misma letra en cada columna no difieren significativamente entre si según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$)

Tabla 4. Larvas en estado J2 de NQS parasitados por aislados de hongos antagonistas durante enero de 2012 bajo condiciones de laboratorio.

Tratamientos	Promedio de quistes parasitados*
TN10A	0.60 a
TN10B	0.80 a
TRO	0.40 a
Control	0.00 a
DMS	1.03

*Medias con la misma letra en cada columna no difieren significativamente entre si según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$)

En las pruebas de actividad antagónica realizadas durante el mes de agosto de 2012, febrero y marzo de 2013, a nivel de laboratorio, se observó actividad antagónica de los diferentes aislados de *P. lilacinus* y *T. harzianum* sobre huevos y larvas en estado J2 de NQS. El aislado TN9P presentó un promedio mayor de parasitismo sobre huevos de NQS versus el resto de tratamientos evaluados con valores promedio de 54.4%, 55.1% y 48.4% para las tres fechas de siembra (08/2012, 02/2013 y 04/2013) respectivamente. Al realizar las pruebas de análisis de varianzas con la prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5% se confirmó la diferencia entre los aislados fúngicos y el control en las tres fechas de siembra (Tabla 5). El tratamiento control no mostró actividad parasítica sobre los huevos y larvas J2 de NQS

Tabla 5. Huevos de NQS parasitados por aislados de hongos antagonistas en agosto de 2012, febrero y marzo de 2013 bajo condiciones de laboratorio.

Tratamientos	Huevos parasitados*		
	Agosto 2012	Febrero 2013	Marzo 2013
TN9P	182.00 a	170.83 a	176.83 a
TN9C	125.50 b	133.17 b	132.33 b
TN10A	112.00 bc	119.33 bc	112.00 bc
TN10B	97.17 c	98.83 c	98.17 c
TRO	56.67 d	63.00 d	53.17 d
Control	0.00 e	0.00 e	0.00 e
DMS	28.33	25.39	27.18

*Medias con la misma letra en cada columna no difieren significativamente entre si según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$)

En esta segunda ronda de pruebas los diferentes aislados fúngicos mostraron antagonismo sobre las larvas en estado J2 a nivel de laboratorio. Los aislados TN9P y TN9C presentaron promedios de 2 larvas parasitadas durante las tres fechas de siembra. Los análisis de varianza con un nivel de significancia de 5% detectaron diferencias entre el número de larvas parasitadas por los aislados TN9P y TN9C y el tratamiento control. El aislado con el que se obtuvo mayor parasitismo fue el TN9P mientras que con el tratamiento control no se observó parasitismo sobre las larvas (Tabla 6). Sin embargo los análisis de varianza realizados para los tratamientos constituidos por TN10A, TN10B, TRO no mostraron diferencias significativas entre el número promedio de larvas parasitadas por estos aislados y el tratamiento control (Tabla 6).

Tabla 6. Larvas en estado J2 de NQS parasitadas por hongos antagonistas durante los experimentos realizados en los meses de agosto de 2012, febrero y marzo de 2013 bajo condiciones de laboratorio.

Tratamientos	Larvas parasitadas*		
	Agosto 2012	Febrero 2013	Marzo 2013
TN9P	1.83 a	2.17 a	1.67 a
TN9C	1.33 a	2.00 a	1.17 a
TN10A	1.00 ab	1.17 ab	1.00 ab
TN10B	1.00 ab	1.00 ab	0.83 ab
TRO	0.83 ab	1.00 ab	0.67 ab
Control	0.00 b	0.00 b	0.00 b
DMS	1.24	1.75	1.03

*Medias con la misma letra en cada columna no difieren significativamente entre si según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$)

5.3. Actividad antagónica en invernadero

Después de 48 horas de inoculados los diferentes tratamientos en las tres fechas de siembra y 48 horas de exposición en cámara húmeda se evaluaron las 12 réplicas de cada tratamiento (láminas de alginato) y se registraron los datos de número de huevos y larvas J2 de NQS parasitadas. Estas evaluaciones se realizaron revisando las láminas bajo microscopio con aumento de 10X y 40X. Los huevos parasitados presentaron tejido micelial sobre la superficie del cascarón

(Figura 9). A estos datos se les realizó una prueba de Tukey ($p \leq 0.05$), los cuales demostraron diferencias entre los tratamientos de *P. lilacinus* y el control (Tabla 7). El tratamiento con el aislado de *T. harzianum* también arrojó diferencias significativas en el número de huevos de NQS parasitados al compararlas con el tratamiento control (Tabla 7). El promedio de huevos parasitados por el aislado TN9P resultó mayor al resto de tratamientos para las tres fechas de siembra (agosto de 2012, febrero y abril de 2013). El aislado TRO de *T. harzianum* resultó con el menor promedio de huevos parasitados (Tabla 7).

Tabla 7. Huevos de NQS expuestos a cinco aislados fúngicos con potencial antagonista en experimentos de invernadero realizados en los meses de agosto de 2012 y febrero y abril de 2013.

Tratamientos	Huevos parasitados*		
	Agosto de 2012	* Febrero de 2013	Abril de 2013
TN9P	160.83 a	156.92 a	145.67 a
TN9C	114.17 b	121.92 b	114.00 b
TN10A	111.75 b	109.17 b	108.75 b
TN10B	99.08 b	104.17 b	108.42 b
TRO	37.25 c	45.00 c	42.0 c
Control	0.0 d	0.0 d	0.0 d
DMS	16.86	19.82	22.69

*Medias con la misma letra en cada columna no difieren significativamente entre si según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$)-

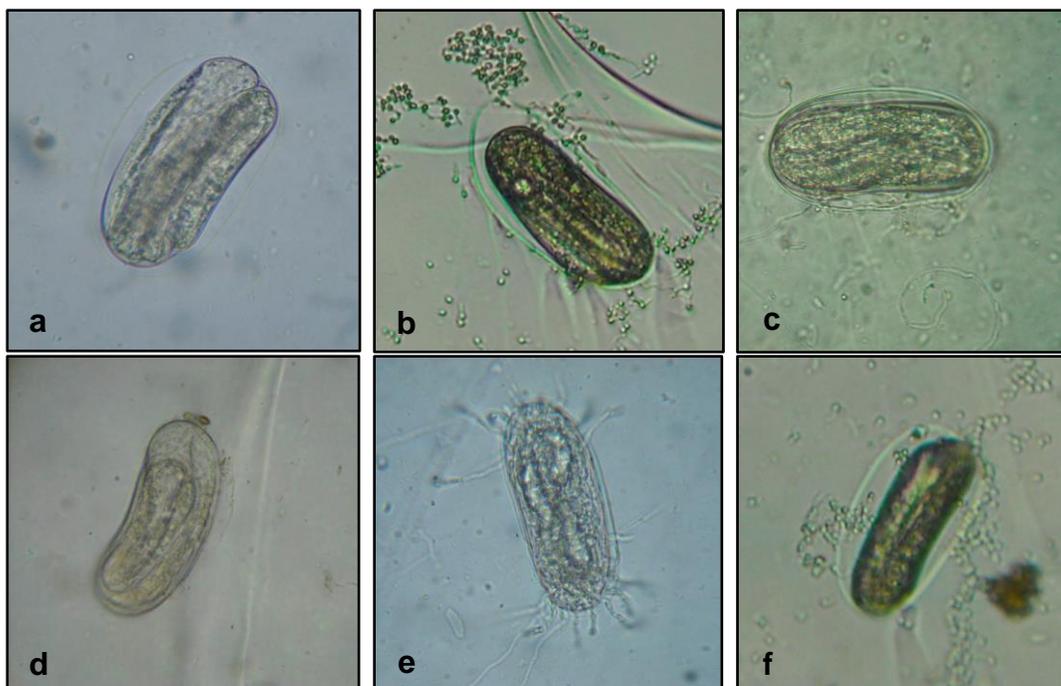


Figura 99. Huevos de NQS parasitados por los diferentes aislados de hongos antagónicos. (a) huevo sin presencia de micelio fúngico; (b) huevo con micelio fúngico de aislado TN9P y presencia de conidias; (c) huevo con micelio fúngico de aislado TN10A y presencia de conidias; (d) huevo con micelio del aislado TN9C y presencia de conidias; (e) huevo con micelio fúngico de aislado TN10B; (f) huevo con micelio fúngico de aislado TRO

Las observaciones realizadas en la cutícula de las larvas de NQS después de 48 horas de inoculadas con los diferentes aislados de hongos antagónicos y 48 horas en cámara húmeda revelaron la presencia de micelio o actividad parasítica (Figura 10). Según el conteo y registro del número de larvas parasitadas por los diferentes aislados existen diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en el número de larvas J2 parasitadas. Las larvas expuestas a los cuatro aislados de *P. lilacinus* fueron parasitadas en ambas fechas de siembra (agosto 2012 y abril 2013) (Figura 10, Tabla 8). En los resultados obtenidos en la siembra de febrero de 2013, solo dos aislados de *P. lilacinus* (TN9P y TN10B) mostraron diferencias significativas con respecto al tratamiento control (Tabla 8).

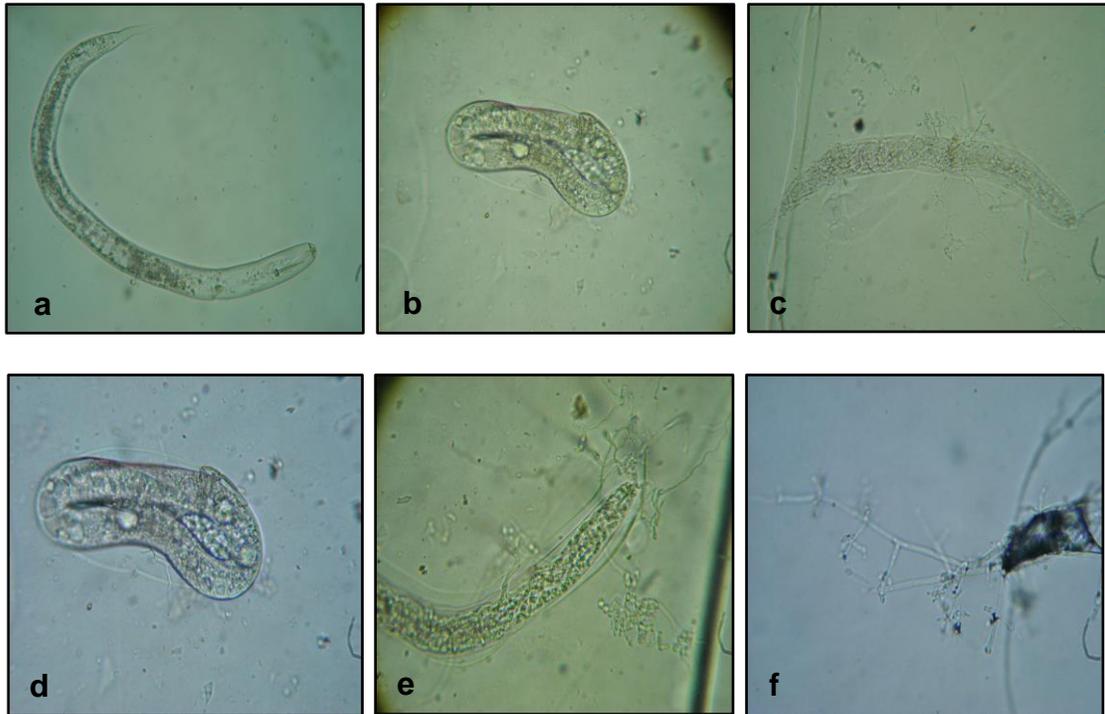


Figura 100. Larvas en estado J2 de NQS parasitadas por los diferentes aislados de hongos antagonicos. a) Larva no parasitada b) larva con presencia de micelio con micelio fúngico de aislado TN9P y presencia de conidias; c) larva con micelio fúngico de aislado TN9C; d) larva con micelio fúngico de aislado TN10A; e) larva con micelio fúngico de aislado TN10B; f) micelio de aislado TRO emergiendo por la apertura anal de una larva de NQS.

Los resultados en el número de larvas J2 de NQS parasitadas por los aislados fueron muy similares entre ellos, con un promedio de parasitismo entre 1 y 0 larvas en un intervalo de tiempo de 96 horas. Sin embargo, el aislado en el que se obtuvo el mayor número de larvas parasitadas fue el TN9P en las tres fechas de siembra. Al realizar un análisis por fecha de siembra, se encontró que para las siembra realizadas durante los meses de agosto de 2012 y abril del 2013 los aislados de *P. lilacinus* (TN9P, TN9C, TN10A y TN10B) no mostraron diferencias significativas entre ellos, pero si se encontró diferencias entre el promedio del tratamiento control (Tabla 8).

Tabla 8. Larvas J2 de NQS parasitadas con los diferentes tratamientos en las tres fechas de siembra.

Tratamientos	Larvas parasitadas*		
	Agosto 2012	Febrero 2013	Abril 2013
TN9P	1.08 a	1.33 a	1.08 a
TN10A	0.92 a	0.75 ab	0.92 a
TN9C	0.83 a	0.67 ab	0.92 a
TRO	0.67 a	0.67 ab	0.75 ab
TN10B	0.67 a	0.83 a	1.00 a
Control	0.00 b	0.00 b	0.00 b
DMS	0.53	0.78	0.82

*Medias con la misma letra en cada columna no difieren significativamente entre si según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$)

Después de dos semanas de inoculados los diferentes tratamientos se evaluaron cinco plantas seleccionadas al azar por cada tratamiento y se registraron los datos de peso fresco y longitud de las raíz de las plantas de soya. El análisis de estos datos arrojó que *P. lilacinus* no ocasiona un impacto negativo sobre el desarrollo radicular de las plantas ya que no se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en cuanto a la longitud de la raíz de las plantas con las plantas control. Caso contrario se observó con el tratamiento a base del aislado de *T. harzianum*, que si aparenta estimular el crecimiento y favorecer el desarrollo de las raíces. Las plantas inoculadas con este tratamiento mostraron un impacto positivo en el crecimiento y peso radicular de las plántulas (Tabla 9 y 10).

Tabla 9. Longitud de raíz de soya inoculada con diferentes hongos antagónicos en tres fechas de siembra.

Tratamientos	Longitud raíz (cm.)*		
	Agosto 2012	Febrero 2013	Abril 2013
TN9P	25.20 b	26.34 a	26.02 b
TN9C	26.22 b	25.80 a	23.88 b
TN10A	25.44 b	25.50 a	25.78 b
TN10B	24.70 b	24.90 a	23.64 b
TRO	34.12 a	32.86 a	34.70 a
Control	27.12 ab	25.72 a	24.86 b
DMS	7.27	8.31	4.92

*Medias con la misma letra en cada columna no difieren significativamente entre si según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$)

Tabla 10. Peso de raíz de plantas de soya inoculadas con diferentes hongos antagonísticos en tres fechas de siembra.

Tratamientos	Peso raíz (gr.)*		
	Agosto 2012	Febrero 2013	Abril 2013
TN9P	4.97 a	4.89 ab	4.76 b
TN9C	5.15 a	5.21 ab	4.56 b
TN10A	5.30 a	4.92 ab	5.10 b
TN10B	4.67 a	4.56 b	4.64 b
TRO	5.47 a	6.64 a	6.75 a
Control	5.20 a	4.78 ab	4.98 b
DMS	2.20	2.05	1.39

*Medias con la misma letra en cada columna no difieren significativamente entre si según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$)

Los resultados obtenidos demuestran que los hongos aislados tienen potencial para utilizarse como agentes de biocontrol de NQS, ya que actuaron como hongos parásitos de huevos de NQS y no demostraron afectar el desarrollo de las plantas de soya. Además, los resultados obtenidos con el aislado TRO de *T. harzianum* demuestran que aunque ejercen una leve actividad parasítica sobre los huevos del NQS, este aislado favoreció el desarrollo radicular de las plantas de soya.

5.4. Nematodos en la raíz de soya

Los nematodos encontrados en las raíces teñidas se contabilizaron y se realizó una prueba de Tukey con un nivel de significancia de 5 %, los cuales no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos. Solo se encontraron de una (1) a dos (2) larvas de NQS penetrando la raíz de las plantas de soya en todos los tratamientos, incluyendo el control (Tabla 11, Figura 11a). Los resultados obtenidos en el conteo de hembras de NQS en las raíces de soya fueron similares al de las larvas, y tampoco se detectaron diferencias significativas para las tres fechas de siembra (Tabla 12, Figura 11b).

Tabla 11. Número de larvas J2 de NQS en raíz de plantas inoculadas con hongos antagonísticos durante tres fechas de siembra.

Tratamientos	Número de larvas*		
	Agosto 2012	Febrero 2013	Abril 2013
TN9P	1.8 a	2.00 a	1.60 a
TN9C	2 a	1.80 a	2.00 a
TN10A	1.6 a	2.00 a	1.80 a
TN10B	1.8 a	1.80 a	1.80 a
TRO	1.6 a	2.20 a	2.00 a
Control	2 a	2.00 a	2.00 a
DMS	2.11	1.51	2.35

*Medias con la misma letra en cada columna no difieren significativamente entre si según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$)

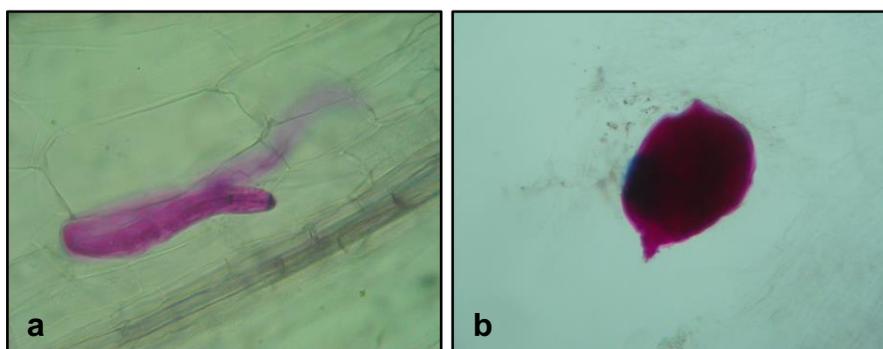


Figura 11. (a) Larvas y (b) Hembras de NQS teñidas con cristales de fucsina ácida dentro de raíces de soya.

Tabla 12. Número de hembras de NQS teñidas en raíz de plantas inoculadas con seis aislados de hongos antagonísticos durante tres fechas de siembra.

Tratamientos	Número de hembras*		
	Agosto 2012	Febrero 2013	Abril 2013
TN9P	0.80 a	0.60 a	0.60 a
TN9C	0.40 a	0.40 a	0.80 a
TN10A	0.60 a	0.60 a	0.40 a
TN10B	0.80 a	0.80 a	0.60 a
TRO	0.40 a	0.60 a	0.40 a
Control	0.60 a	0.40 a	0.60 a
DMS	1.31	1.31	1.04

*Medias con la misma letra en cada columna no difieren significativamente entre si según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$)

5.5. Postulados de Koch

Las pruebas de patogenicidad revelaron que los hongos aislados en las placas correspondían a los hongos evaluados como agentes potenciales de biocontrol. Luego de dos días (48 horas), las placas inoculadas con quistes infectados con *T. harzianum*, mostraron un crecimiento micelial de color blanco y textura algodonosa sobre la estructura quística. Al observarse en detalle la placa mostró un crecimiento de conformación radial (Figura 12). Esta colonia fúngica después de tres días el micelio cambió de blanco a verde oliva. Observaciones microscópicas realizadas a sus estructuras reproductivas corroboraron la identificación de *T. harzianum* al (Figura 12).

Resultados similares se encontraron en las placas Petri inoculadas con los quistes infectados con los aislados TN9C y TN10B. En esta ocasión se observó crecimiento de colonias fúngicas después de 3 días, con micelio aéreo de apariencia algodonosa y color blanco, que después de cinco días cambió la coloración a lila. El envés cambio de coloración a un tono ámbar, con plegamiento del mismo (Figura 13 y 14).

Las placas Petri con PDA y quitina que se inocularon con los quistes tratados con el aislado TN9P, después del tercer día mostraron un crecimiento lento, con escaso micelio aéreo de coloración blanca, que después de siete días cambió su textura de algodonosa y escasa a una textura polvosa y de coloración lila. Esto corroboró que se trataba del mismo aislado utilizado inicialmente para realizar la prueba de antagonismo (Figura 15). Las placas Petri inoculadas con TN10A mostraron un crecimiento fúngico más rápido que los anteriores. A los dos días se observó micelio aéreo alto de color blanco. Después de ocho días el micelio cambió de coloración a lila. El patrón de crecimiento en anillo confirmó que se trataba del mismo aislado utilizado para realizar la prueba de antagonismo (Figura 16).

De igual forma, las pruebas de patogenicidad realizadas en los experimentos de laboratorio e invernadero con las láminas de alginato corroboraron que los aislados correspondían a los hongos inicialmente inoculados.

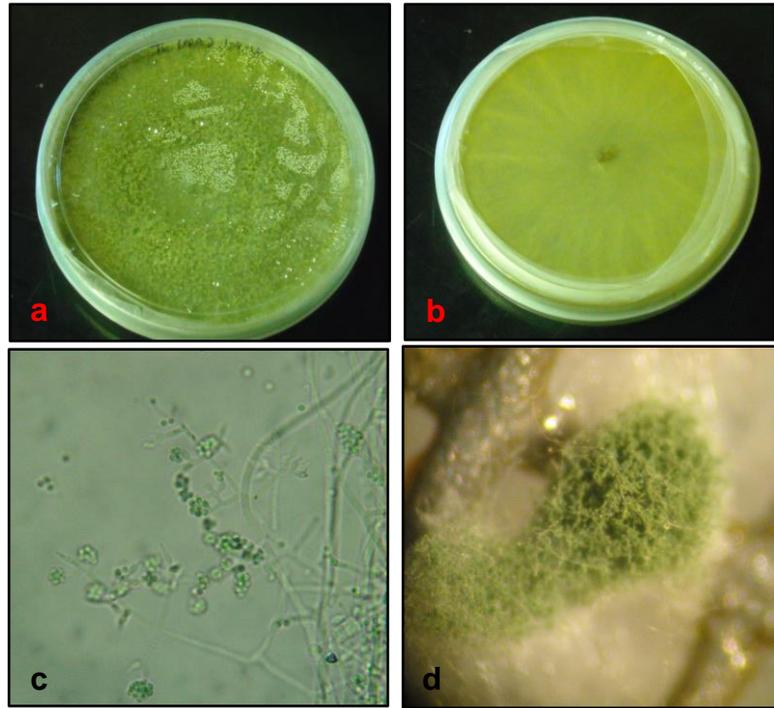


Figura 1211. Aislado de *T. harzianum* (TRO). (a y b) observado macroscópicamente, (c) hifas y conidias observadas microscópica con aumento de 40X y (d) quiste de NQS con micelio fúngico bajo aumento de 10X.

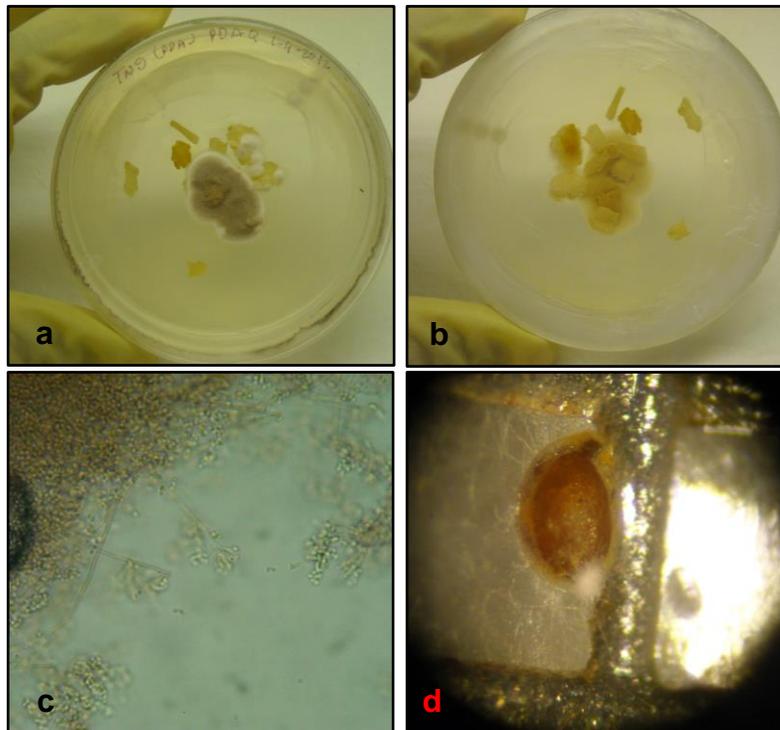


Figura 1312. Aislado de *P. lilacinus* TN9C. (a y b) observado macroscópicamente, (c) hifas y conidias observados microscópica con aumento de 40X y (d) quiste de NQS con micelio fúngico bajo aumento de 10X.

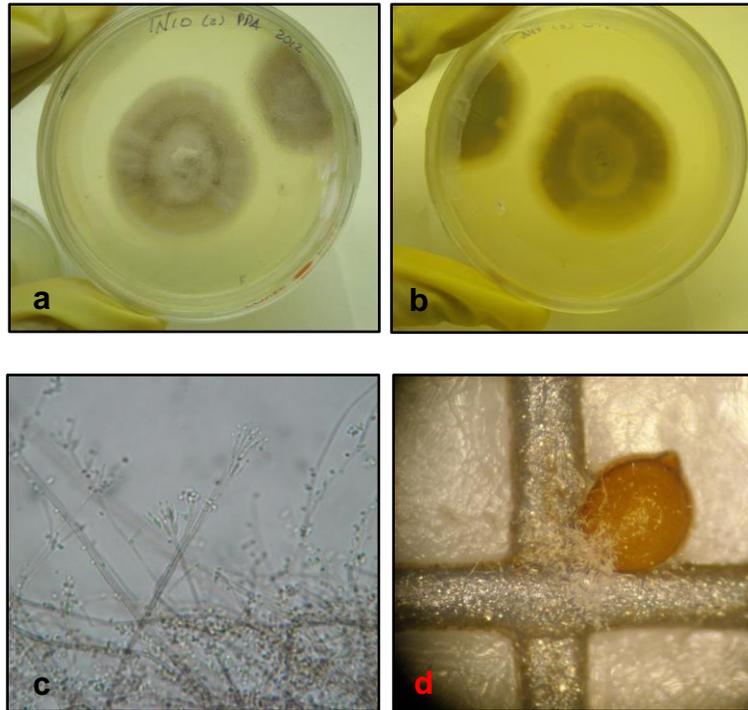


Figura 13. Aislados de *P. lilacinus* TN10B. (a y b) observados macroscópicamente, (c)) hifas y conidias observados microscópica con aumento de 40X y (d) quiste de NQS con micelio fúngico bajo aumento de 10X.

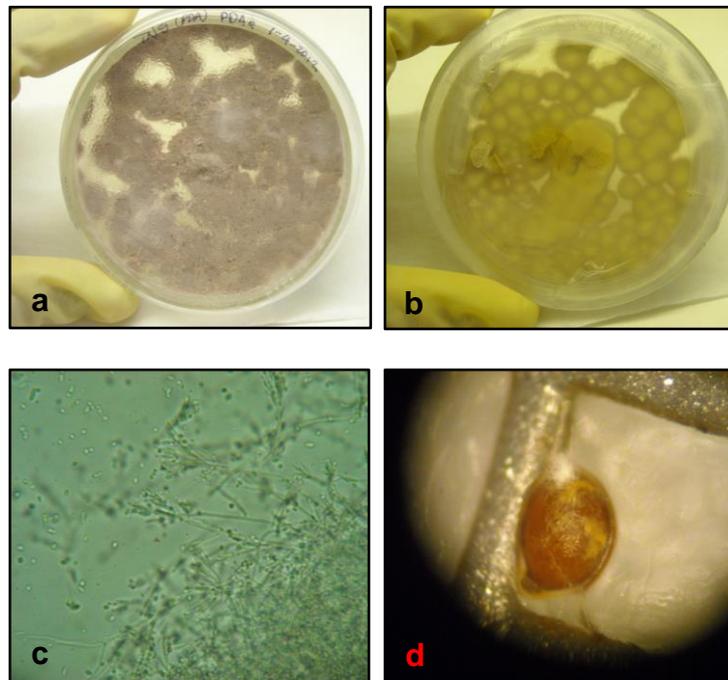


Figura 14. Aislado de *P. lilacinus* TN9P (a y b) observados macroscópicamente, (c) hifas y conidias observados microscópica con aumento de 40X y (d) quiste de NQS con micelio fúngico bajo aumento de 10X.

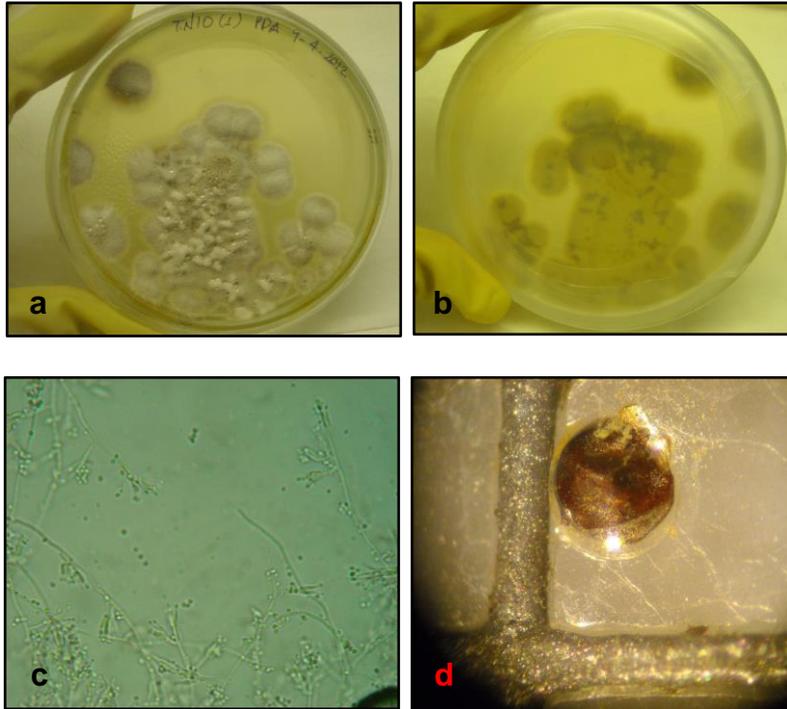


Figura 156. Aislados de *P. lilacinus* TN10A. (a y b) observados macroscópicamente, (c) hifas y conidias observados microscópica con aumento de 40X y (d) quiste de NQS con micelio fúngico bajo aumento de 10X.

6. DISCUSIÓN

El hallazgo de encontrar mayor número de hongos con propiedades antagónicas sobre el NQS sostiene la teoría que las áreas boscosas son un lugar adecuado para la búsqueda de agentes benéficos para la agricultura. La presencia de cuatro aislados de *P. lilacinus* podría indicar que la biodiversidad en los suelos boscosas es mayor que en los suelos agrícolas. Este género se caracteriza por habitar en suelos con gran cantidad de materia orgánica (Piedra, 2008). Por otro lado, la identificación de *T. harzianum* en las muestras de suelo provenientes de Isabela pudiera explicarse como una respuesta de dinámica poblacional natural, donde a un aumento en las poblaciones del NQS promueve un aumento de sus enemigos naturales. Estos hongos además de ser parásitos de nematodos, tienen capacidad saprofítica, lo que explica su presencia en un suelo impactado por la agricultura. Infante y colaboradores (2009) reportan que los hongos saprofíticos pueden sobrevivir en los residuos de materia orgánica de los suelos, utilizándola para obtener el carbono necesario y sobrevivir hasta tener a su alcance un huésped. Diferentes especies de estos géneros, además de ser saprófitos facultativos, pueden encontrarse en diferentes latitudes como zonas polares y zonas tropicales (Infante et al., 2009; Rodríguez Dos Santos y del Pozo Núñez, 2003; Jimenez y Gallo 1986).

Los diferentes aislados recuperados de las muestras de suelo se desarrollaron muy bien en el medio de cultivo que contenía quitina. Esto se debe a la producción de enzimas quitinolíticas de estos hongos, que les permiten degradar y aprovechar este compuesto, mejorando así su capacidad antagónica parasítica al estimular la producción de estas enzimas (Harman et al., 1993; Infante et al., 2009).

A pesar de lograr la identificación de *P. lilacinus*. a nivel de especie, los resultados tienden a indicar que se trata de cuatro aislados distintos. Esto se sustenta en la respuesta antagónica sobre los huevos y larvas del nematodo del quiste de la soya, donde se observaron diferencias. Además, se registraron

diferencias en la morfología y color de las colonias. Según estudios (Almeida et al., 2001., Infante et al., 2009) existe gran variabilidad genética en estos hongos. Las pruebas en agar quitina evidenciaron diferencias en la producción de quitinasas, cuando se observan variabilidad de crecimiento y diferencias en el desarrollo de las colonias en el medio (Harman et al., 1993). En los resultados obtenidos en este estudio se observaron diferentes valores en cuanto al parasitismo de estos aislados sobre huevos y larvas de NQS. Probablemente, la variabilidad en el contenido de quitinasa producida por el hongo está relacionada con el daño al huevo (Bhat et al., 2009). Por esta razón muchos autores han recomendado el uso de quitina para estimular la producción de enzimas quitinolíticas y mejorar así su capacidad antagonica (Harman et al., 1993; Infante et al., 2009). En los resultados obtenidos en los medio de cultivo modificados con quitina se observó un mejor desarrollo y una mayor producción de esporas ratificando la experiencia obtenida por estos autores. Según estudios realizados por Culbreath y colaboradores (1986) citado por Jiménez y Gallo (1986), la adición de quitina al medio de cultivo promueve un mejor desarrollo de *Paecilomyces* sp. y aumenta su actividad nematofaga sobre *Meloidogyne arenaria*, estos estudios concuerdan con los resultados obtenidos con los diferentes aislado de *P. lilacinus* sobre medio con quitina en los cuales se observó una mayor esporulación de los aislados y un rápido desarrollo micelial.

El bajo número de quistes de NQS parasitados por los hongos pudo deberse a las características morfológicas de estas hembras, las cuales se diferencian de otros géneros de nematodos porque sufren una transformación en su etapa adulta, al adquirir una conformación de quiste, que se forma al desarrollarse unas estructuras como sacos gelatinosos que protege a los huevos. Durante este proceso de transformación se produce un endurecimiento y cambio de color en la cutícula de la hembra y la formación de una capa gelatinosa de color blanco con la posterior muerte de la hembra, el espesor y estructura varia en los diferentes especies de *Heterodera* (Oyekanmi et al., 2010). Las características morfológicas de los nematodos formadores de quistes, permiten que las larvas y huevos

permanezcan dentro de la estructura quística durante largos periodos de tiempo esperando que se den las condiciones óptimas para que ellas emerjan del quiste en busca de raíces nuevas de soya (Bhat et al., 2009). Además, las larvas J2 y huevos de NQS se caracterizan por presentar una cutícula conformada por dos capas diferentes: una exocutícula y la endocutícula que les confieren protección contra la desecación y el ataque de microorganismo parasitoides y depredadores (Romero, 1976)

Los aislados de *P. lilacinus*, en general mostraron mayor efecto parasítico sobre el nematodo que *T. harzianum*. Sin embargo, *T. harzianum* presentó una mejor tendencia a estimular el desarrollo de la raíz de las plantas de soya. Este mecanismo, promocionan el crecimiento en la planta, es muy conocido y existen estudios que asocian a *Trichoderma* con este modo de acción (Leelavathi et al., 2014.; Shores et al., 2004).

Durante los experimentos a nivel de laboratorio e invernadero los aislados de *P. lilacinus* mostraron tener un mayor efecto parasítico sobre los huevos de NQS. Resultados similares han sido reportados por diversos autores que han realizado experimentos a nivel de invernadero con este hongo como medida de control del nematodo nodulador *Meloidogyne* (Jiménez et al., 1986; Culbreath et al., 1986; Jiménez y Gallo, 1986 y Bhat et al., 2009). Estudios similares se han realizado en Perú, donde se ha observado a este hongo parasitando huevos de *Meloidogyne incognita* y hembras de *Globodera pallida* en plantaciones de papa (Landaverde, 2012). Los resultados obtenidos a nivel de invernadero demuestran el potencial antagónico de *P. lilacinus* para usarse en el manejo de NQS por la efectividad parasítica sobre huevos.

La actividad parasítica ejercida por los diferentes aislados de *P. lilacinus* sobre los huevos de NQS se puede explicar por la acción colonizadora del hongo sobre las estructuras cuticulares de los nematodos, ya que esto ocurre cuando los

nematodos se encuentran en estadios sedentarios dentro de su ciclo de vida (Jiménez y Gallo, 1986). Los nematodos fitoparasíticos sedentarios son más vulnerables al ataque por parte de estos hongos tanto dentro como por fuera de la raíz de las plantas hospederas. Son diversos los autores que han demostrado la efectividad de este hongo para el control de nematodos noduladores con porcentajes de parasitismo de hasta 76.25% sobre huevos a nivel de invernadero. En nuestro caso el aislado que mejor actuó sobre huevos de NQS fue el TN9P con porcentajes de parasitismo sobre huevos de 54.4%, 55.1% y 48.4% en las tres pocas de siembra de los experimentos a nivel de invernadero. Son diversos los estudios que se han realizado sobre la capacidad de *P. lilacinus* para penetrar en la pared de los huevos de nematodos fitoparasíticos, invadiéndolos y provocando cambios en su estructura: capa vitelina, la capa de quitina y la capa lipídica (Jimenez y Gallo 1986; Bhat et al., 2009; Cardona y Leguizamon, 1997 y Khan y Williams, 1998).

7. CONCLUSIONES

En este estudio se logró caracterizar varios aislados con potencial biocontrolador del nematodo del quiste de la soya (NQS). Los resultados fueron apoyados por la literatura al identificarse los hongos del género *Paecilomyces* y *Trichoderma*. Estos aislados degradaron el cascaron de los huevos de *H. glycines*, inhibiendo su eclosión y desnaturalizan la cutícula de las larvas. De igual forma, sustenta mi hipótesis que considera las áreas boscosas como una fuente de microorganismos con características antagónicas a nematodos y que el uso de medio de cultivo con quitina es muy adecuado para el estudio de *P. lilacinus* y *T. harzianum*.

De esta investigación puedo concluir que los microorganismos quitinolíticos antagonistas de nematodos fitoparasíticos como *P. lilacinus* son una alternativa para el biocontrol de aquellas especies que producen sus huevos en grupo o en forma conglomerada, ya que los tres ensayos experimentales de invernadero revelaron que el hongo *P. lilacinus* presenta un alto grado de parasitismo sobre NQS, su uso contribuye a reducir el número de huevos y larvas de este nematodo y que el aislado de *T. harzianum* puede contribuir al crecimiento de las plantas de soya.

Es necesario estudiar más a fondo los diferentes modos de acción o mecanismos que presentan estos hongos antagónicos antes de incluirlos en un programa de manejo integrado de nematodos fitoparasíticos.

8. RECOMENDACIONES

Para implementar un manejo integrado de nematodos fitoparasíticos usando los aislados fúngicos encontrados en las zonas de reserva de los bosques de Puerto Rico utilizados es recomendable efectuar ensayo a nivel de campo que permitan evaluar su efectividad sobre el desarrollo del NQS.

Teniendo en cuenta las diferencias en los promedios de parasitismo de huevos de NQS obtenidos con los cuatro aislados de *P. lilacinus* se recomienda realizar futuras pruebas moleculares a estos para corroborar si se trata de la misma especie o por el contrario son especies diferentes.

Se recomienda realizar pruebas de antagonismo entre los aislados de *P. lilacinus* y *T. harzianum* sobre otros organismos plaga de Puerto Rico, teniendo en cuenta que estos hongos son nativos de la isla.

Para lograr más eficiencia en futuros estudios que involucren la evaluación de hongos antagónicos sobre organismos plaga se recomienda tener laboratorios e invernaderos mejor equipados que permitan mantener un mayor control y promuevan la homogeneidad de las condiciones para todas las unidades experimentales.

9. LITERATURA CITADA

Allendes, L. G. y E. L. López. 2007. Evaluación de ocho cepas nativas de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Metsh) Sorokin, para el control de *Aleurothrixus floccosus* Maskell. Tesis Ing. Agr. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Chile. 38p.

Barnett, H.L. and B.B. Hunter, 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. The American Phytopathological Society, 4th Edition, Minnesota, USA. 218p.

Bhat, M.Y., H. Muddin, and N. A. Bhat. 2009. Histological interactions of *Paecilomyces lilacinus* and *Meloidogyne incognita* on bitter gourd. Journal of American Science. 5(1):8-12.

Cabanillas, E., Baker, K.P. and L.A. Nelson. 1989. Growth of isolates of *Paecilomyces lilacinus* and their efficacy in biocontrol of *Meloidogyne incognita* on Tomato. Journal of Nematology.21:164-172.

Cardona, B.N.L. and C.J.E. Leguizamon. 1997. Isolation and pathogenicity of fungi and bacteria to the root-knot nematode of coffee *Meloidogyne* spp. Fitopatología Colombiana. 21:39-52.

Chang, Y.-C., Chang, Y.-C, and R. Baker. 1986. Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. Plant Disease 70: 145-148.

Chavarría, M., L. Uribe., y A. Bolaños. 2005. Microorganismos benéficos en el control de enfermedades en jengibre. Agronomía Costarricense 29(3):149-155.

Davila, N.M. 1990. Estudio y clasificación de hongos asociados al nematodo nodulador, *Meloidogyne inconigta* en algunos suelos agrícolas de Puerto Rico. Tesis M.S. Universidad de Puerto Rico. Mayagüez. 139p.

Elósegui, C.O., R.J. Jiménez, y P.A. Carr. 2006. Aislamiento, identificación y caracterización morfométrica de aislados nativos de hongos mitospóricos con potencialidad para el control de especies de insectos plaga. La Habana, Cuba. Fitosanidad. (10)4:265-272.

FAO. 2009. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. Available at: <http://faostat.fao.org> (accessed 8 September 2009).

Gallardo, C.F., E. Hernández y J. Pagán. 2009. Presencia natural del hongo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. en la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari), en Puerto Rico. Resúmenes Sociedad Puertorriqueña de Ciencias Agrícolas.

García, D.A., P.A. Bustillo., V.U. Castro, y B.Y. Arenas. 2012. Selección de hongos entomopatógenos para controlar salivazos (Hemiptera: Cercopidae) de la caña de azúcar en Colombia. Revista Colombiana de Entomología 38 (2): 252-259

Harman, G.E., Björkman, T., Ondik, K. and M. Shoresh. 2008. Changing paradigms on the mode of action and uses of *Trichoderma* spp. for biocontrol. Out looks on Pest Management. 96: 190-194

Harman, G. E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. Phytopathology. 96:190-194.

Harman, G.E., Hayes, C.K., Lorito, M., Broadway, R.M. Di Pietro, A., Peterbauer, C and A. Tronsmo. 1993. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: Purification of Chitobiosidase and Endochitinase. Molecular Plant Pathology 83(3):313-318.

Hartman, G. L. and C.B. Hill. 2010. Diseases of soybean and their management. p. 276-299. In. Singh. G. ed. A The soybean: Botany, production and uses. India. 494p

Hokkanen, H y D. Pimentel. 1984. New approach for selecting biological control agents. Canadian Entomologist. 116:1109-1121.

Infante, D., Martínez, B., González, N., y Y. Reyes. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. Protección Vegetal. 24 (1):14-21.

Jiménez, R.M y P.D. Gallo. 1986. Nuevos aportes sobre la efectividad de *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson en el control de nematodo del nódulo de la raíz (*Meloidogyne* spp). IDESIA. 10:29-33.

Kim, Y.H., Kim, K.S. and R.D. Riggs. 2010. Differential subcellular responses in resistance soybeans infected with soybean cyst nematode races. The plant Pathology Journal. 26(2):154-158.

Kumudini, S. 2010. Soybean growth and developmet. Pp. 48-73. In Singh. G. ed. An The soybean: Botany, production and uses. India. 494p.

Landaverde, A.J.I. 2012. Uso de dos estrategias de control del nematodo dorado y fertilización del suelo en cultivo de papa. Tesis: Ing. Agrónomo. Universidad Veracruzana. Mexico. 48p.

Leelavathi, M.S., L. Vani, and P. Reena. 2014. Antimicrobial activity of *Trichoderma harzianum* against bacteria and fungi. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 3(1):96-103.

López Lastra, C.C y A.C Scorsetti. 2007. Revisión de los hongos entomophorales (Zygomycota: Zygomycetes) patógenos de insectos de la República de Argentina. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica. 42 (1-2):33-37.

López, M. 1995. *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson: Caracterización, Reproducción y obtención de un Biopreparado con Efecto Nematicida. Tesis PhD. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV), La Habana, Cuba. 80p.

Marcondes de Almeida, J. E. y A. Batista. 2001. Banco de microorganismos entomopatogênicos. Biotecnología ciência & desenvolvimento. (20):30-33

Meyer, F.S., Huettel, R.N., and R.M. Sayre. 1990. Isolation of fungi from *Heterodera glycines* and *in vitro* bioassays for the antagonism to eggs. Journal of Nematology. 22(4):532-537.

Mishra, J. S. 2010. Weed management in soybean. Pp. 209-226. In Singh. G. ed. An The soybean: Botany, production and uses. India. 494p.

Morales-Malleri, R. 2006. Manejo de nematodos fitoparasíticos utilizando productos naturales y biológicos. Tesis M.S. Universidad de Puerto Rico. Mayagüez. 87p.

Niblack, T.L. 2005. Soybean cyst nematode management reconsidered. The American Phytopathological Society. Plant Disease. 89 (10):1020-1026.

Oerke, E. C. 2006. Crop losses to pests. Journal of Agricultural Science. 144:31-43.

Olivares-Bernabeu, C. y L. V. López-Llorca. 2002. Fungal egg-parasites of plant-parasitic nematodes from Spanish soils. *Revista Iberoamericana de Micología*. 19:104-110.

Opperman, C.H., y D.M. Bird. 1998. The soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*: a genetic model system for the study of plant-parasitic nematodes. *Current Opinions in Plant Biology*. (1):342-346.

Oyekanmi. E.O. and B. Fawole. 2010. Nematodes of soybean and their management. p. 325-344. In. Singh. G. ed. *A The soybean: Botany, production and uses*. India. 494p.

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

Prior, C. 1992. Discovery and characterization of fungal pathogens for locust and grassopper control. p. 230-238. In C. Lomer and C. Prior, eds. *A Biological Control of Locusts and grasshoppers*. International Institute of Biological Control. Redwood Press. Melksham, UK.

Rodríguez, M. A. 2002. Manual de recomendaciones técnicas para el manejo de plagas de la caña de azúcar. Dirección de Investigación y Extensión de la Caña de Azúcar (DIECA). San José Costa Rica. 60p.

Rodríguez Dos Santos, A. y N.E. del Pozo, 2003. Aislamiento de hongos entomopatógenos en Uruguay y su virulencia sobre *Trialeurodes vaporariorum* West. *Agrociencia*. 7(2):71-78.

Romero, M.D. 1976. Morfología e identificación de las especies españolas del género *Heterodera* (Schmidt), 1871 (Nematoda). *Boletín de Servicios. Plagas*, 2:123-143.

Romero-Arenas, O., Huerta, L.M., Huato, M.A., Domínguez, H. F. y V.D. Arellano. 2009. Características de *Trichoderma harzianum*, como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 9(2):143-151.

Shoresh, M., I. Yedidia, and I. Chet. 2005. Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology*. 95(1):76-84

Sikora, R.A, N. Greco, and J. F. Velosa Silva. 2005. Nematode parasites of food legumes. Pp. 259-318. In Luc. M., Sikora. R., and J. Bridge, eds. An Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture 2nd ed. CABI publishing, USA. 917p.

Smith, J.R. and A. Chavarria-Carvajal. 2003. Host suitability of pigeon pea for *Heterodera glycines* race 2. *Nematropica* 32(2):125-130.

Tylka, W. L. 2008. Soybean Cyst Nematode Management. Field Guide. Iowa State University of Science and Technology. Iowa Soybean Association. Ames, Iowa University Extension. 55p

Zheng. J.W. and Chen S.Y. 2011. Estimation of virulence type and level of soybean cyst nematode field populations in response to resistant cultivars. *Journal of Entomology and Nematology*. 3(3):37-43.

10. APÉNDICES

Apéndice 1. Medios de Cultivo

Medio de cultivo Agar Ohio

Agar	20 g
Glucosa	5 g
Extracto de levadura	2 g
NaNO ₃	1 g
MgSO ₄ -7H ₂ O	0.5 g
KH ₂ PO ₄	1 g
Oxgall	1 g
Propionato de Sodio	1 g
ADE	1 L

Disolver en agua destilada estéril los ingredientes y autoclavar a 125 °C y 15 lb de presión durante 30 minutos. Posteriormente, se deja enfriar hasta aproximadamente 45° C y se adiciona los siguientes antibióticos.

Cloromicetina	0.05 g
Estreptomicina sulfatada	0.05 g

Mezclar bien y sirve en platos Petri.

Medio de cultivo Agar de papa y dextrosa (PDA)

PDA	39 g
ADE	1 L

Disolver en agua destilada estéril los ingredientes y autoclavar a 125 °C y 15 lb de presión durante 30 minutos. Posteriormente, se deja enfriar hasta aproximadamente 45° C para adicionar 30 gotas de ácido láctico, se mezcla bien y se sirve en platos Petri.

Medio de cultivo Agar rosa de bengala

Agar	15 g
ADE	1 L
Rosa de bengala	0.05 g
Glucosa	10 g
Sulfato de magnesio	0.5 g
Peptona bacteriológica	5 g
Potasio dihidrógeno fosfato	1 g
pH	7.0 ± 0.2

Disolver en agua los ingredientes y autoclavar a 125 °C y 15 lb de presión durante 30 minutos. Posteriormente, se deja enfriar hasta aproximadamente 45° C y se adicionan 0.05 g de cloranfenicol, se mezcla bien y se sirve en platos Petri.

Medio de cultivo V8

Agar	20 g
Agua de grifo	600 mL
Jugo V8	400 mL
NaCl	40 g
Dextrosa	1 g

Disolver en agua de grifo los ingredientes y ajustar el pH a 5.2 antes de autoclavar a 125 °C y 15 lb de presión durante 30 minutos. Posteriormente, se deja enfriar y se sirve en platos Petri