



*The World's Largest Open Access Agricultural & Applied Economics Digital Library*

**This document is discoverable and free to researchers across the globe due to the work of AgEcon Search.**

**Help ensure our sustainability.**

Give to AgEcon Search

AgEcon Search

<http://ageconsearch.umn.edu>

[aesearch@umn.edu](mailto:aesearch@umn.edu)

*Papers downloaded from **AgEcon Search** may be used for non-commercial purposes and personal study only. No other use, including posting to another Internet site, is permitted without permission from the copyright owner (not AgEcon Search), or as allowed under the provisions of Fair Use, U.S. Copyright Act, Title 17 U.S.C.*

*No endorsement of AgEcon Search or its fundraising activities by the author(s) of the following work or their employer(s) is intended or implied.*

**PROCEEDINGS  
OF THE  
33<sup>rd</sup> ANNUAL MEETING**

**6-12 July 1997**

**Proceedings Edited  
by  
Nelson Semidey and Lucas N. Aviles**

**Published by the Caribbean Food Crops Society**

## CARACTERIZACION DE RIZOBACTERIAS DE LA *Mucuna deeringiana* Y EL PLATANERO

*I. Natalia Salas T.<sup>1</sup> y R. Vargas Ayala<sup>2</sup>, Estudiante Graduado, Departamento de Protección de Cultivos<sup>1</sup>, Catedrático, Departamento de Protección de Cultivos<sup>2</sup>, RUM., Mayagüez, P. R.*

**RESUMEN.** Muestras de suelo y raíces tomadas de parcelas con mucuna, platanero y mucuna-platanero en asociación fueron evaluadas con el objetivo de determinar poblaciones de bacterias de la rizosfera. Las rizobacterias se aislaron en Agar de Soya Trypticase al 5% usando el método de dilución seriada. Posteriormente, se aislaron y purificaron 10 rizobacterias de la mucuna (6 Gram-negativas, y 4 Gram-positivas) y 7 rizobacterias del platanero (4 Gram-negativas y 3 Gram-positivas) para un total de 17 bacterias aisladas. Se realizó la tinción de esporas con oxalato verde de malaquita al 5%, a siete bacterias Gram-positivas, determinándose dos rizobacterias formadoras de esporas. Estudios in vitro demostraron que dos de las bacterias identificadas como Gram-negativas presentaron un efecto atrayente a nematodos del platanero. Sin embargo, rizobacterias Gram-positivas no mostraron atracción al nematodo. Los resultados sugieren que bacterias provenientes de la rizosfera de mucuna y platanero podrían estar relacionadas con la supresión o atracción de nematodos. El aislar y cuantificar componentes de la rizosfera con posibles propiedades antagonistas podrían resultar en una nueva alternativa para el manejo de nematodos en el platanero.

## INTRODUCCION

El método mas utilizado para reducir pérdidas económicas en los cultivos es el uso de nematicidas por su acción rápida y efectiva. Pero debido a su alto costo y a los efectos adversos que le ocasionan al hombre y al medio ambiente, su uso es más limitado cada día. Esta situación ha aumentado el interés en la evaluación y búsqueda de alternativas de control utilizando enemigos naturales capaces de combatir eficazmente los nematodos (Acosta et al., 1991; National Academy of Sciences, 1968; Román, 1978; Southey, 1978; Taylor y Sasser, 1983; Van Gundy, 1985; Lucas, 1968; Stirling, 1991).

Aunque los hongos antagonistas informados en la literatura predominan en el control de nematodos, estudios recientes han enfatizado y demostrado el gran potencial biocontrolador de las bacterias de la rizosfera en poblaciones de nematodos fitoparásitos y su posible uso en la agricultura como una alternativa de control (Zuckerman y Rhode, 1981; Curl y Truelove, 1986; Stirling, 1991). En 1985, Zavaleta-Mejia (1985) encontraron que aproximadamente una tercera parte de las 326 aislamientos de bacterias probadas causaban al menos un incremento del 10% en el peso seco de plantas de tomate y pepino. En Puerto Rico, Vargas y

Acosta en 1990, informaron sobre *Pasteuria penetrans* asociada a algunas especies de nematodos actuando como agente biopresor. Finalmente, *P. fluorescens* es otra rizobacteria con características biocontroladoras reportada en la literatura que posee propiedades supresoras de nematodos cuando es inoculada alrededor de las raíces, reduciendo la penetración del nematodo nodulador (Stirling, 1991).

El punto de partida para los estudios de control biológico con bacterias de la rizosfera esta con frecuencia relacionado con el aislamiento y caracterización de las mismas (Cook and Baker, 1983). Una fuente posible de agentes controladores biológicos de nematodos fitoparásitos es la rizosfera de plantas las cuales muestran propiedades antagonistas a nematodos. Mas tarde en Alabama, Rodríguez-Kabana y otros, 1988, probaron como rotando con frijol castor se reducía significativamente la población de juveniles de *Meloidogyne arenaria*, seguido de la siembra de marí.

Estudios realizados en Puerto Rico demostraron que plantas y extractos del haba de terciopelo (*Mucuna deeringiana*) redujeron el índice de agallas e infección por *Meloidogyne* incógnita en tomate (Vicente y Acosta, 1987). Igualmente, el efecto de sistemas de rotación con tomate, maíz y haba de terciopelo (*Mucuna deeringiana*) sobre los niveles poblacionales de los nematodes *Meloidogyne* incógnita y *Rotylenchulus* reniformis (Acosta y otros, 1991). El haba de terciopelo (*Mucuna deeringiana*) es resistente al ataque de nematodos y su aparente resistencia se debe a la producción de exudados nematotóxico de la raíz y al efecto antagonista de la población microbial asociada a la rizosfera (Acosta y otros, 1991; Kloepper et.al., 1991).

Vargas y otros, 1994, reportaron el efecto del frijol de terciopelo sobre poblaciones de nematodos fitoparásitos y microflora de la rizosfera. Acosta y otros, 1995, demostraron que un programa de rotación de dos años con *Mucuna* incorporada al suelo seguido de la siembra de tomate fue la táctica mas efectiva en el control del nematodo nodulador y del nematodo reniforme aumentando la producción de tomate en 176% sobre la de tomate continuo.

Estudio realizado en Alabama por Vargas, 1995, relacionado con dinámica poblacional de nematodos y ecología microbial en un programa de rotación con *Mucuna deeringiana* y otros cultivos, sugiere que la rizosfera del haba de terciopelo naturalmente selecciona ciertas especies de hongos y bacterias, soporta poblaciones microbiales y reduce la incidencia de enfermedades causadas por el nematodo nodulador y quiste de la soya, *Meloidogyne* incógnita y *Heterodera glycines*.

El mecanismo preciso por medio del cual estas plantas son antagonistas a nematodos se desconocen (Kloepper, 1991). Es posible que parte de este mecanismo esta basado en los efectos de exudados de raíces (aleloquímicos) sobre la toxicidad, repulsión, atracción y eclosión del huevo. Existen dos mecanismos por los cuales se explica este efecto: mediante la producción de toxinas (productos nematotóxicos) que matan los nematodos o se cree que la planta contiene en cantidades insuficientes o no contiene sustancias necesarias para el desarrollo y reproducción de los nemtodos (Giebel, 1982).

El propósito de este estudio preliminar fue determinar la microflora bacterial de la rizosfera de *mucuna deeringiana* y platanero que presentan niveles de antagonismo sobre nematodos del platanero. Se presentan datos sobre la densidad, diversidad, caracterización e identificación de poblaciones de rizobacterias.

## MATERIALES Y METODOS

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Nematología del Departamento de Protección de Cultivos y el Laboratorio BNF del Departamento de Agronomía de la Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez (RUM) entre Agosto de 1996 y Mayo de 1997.

### Muestreo:

Se obtuvieron 6 muestras de suelo, cerca de la región radical (incluyendo raicillas) de plantas de *Mucuna deeringiana* sp. y platanero (variedades de superplátano y maricongo) procedentes de siembras establecidas en la Subestación Experimental Agrícola de Isabela y Corozal, respectivamente,

Cada muestra estaba constituida de suelo de la rizosfera y raicillas. Se tomaron aproximadamente 50g de cada muestra de suelo a una profundidad de 15.00 cm. Y se transportaron en bolsas plásticas previamente rotuladas al laboratorio de Nematología. Estas se almacenaron en la nevera a una temperatura no menor de 4° C y se procesaron durante las 24 horas siguientes.

### Densidad de población:

Se determinó pesando 10 g de suelo y raíces (5 g de suelo y 5 g de raíces) de cada una de las muestras y se colocaron en frascos de Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 90 ml de agua destilada esterilizada. Los frascos se colocaron en un agitador eléctrico (Eberbach Corporation Ann Arbor, Michigan) durante 30 min. Se prepararon 4 diluciones seriadas hasta  $10^{-4}$ . Se tomaron alícuotas de 0.1 ml de las diluciones  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  y se transfirieron a placas de Petri conteniendo el medio de cultivo Agar de Soya Tripticasa al 5% (AST 5%). Se realizaron un total de dos placas por dilución por muestra. Las placas fueron invertidas e incubadas a 28° C por 48 horas. Posteriormente, se contabilizó el número de las colonias en cada placa y se determinó un promedio de las dos placas expresado en el log de Unidades Formadoras de Colonias por gramo de suelo (log UFC/g).

### Diversidad bacterial:

Colonias individuales seleccionadas a partir de la dilución  $10^{-4}$  y luego de 48 horas de incubación se transfirieron a placas de Petri conteniendo el medio de cultivo AST al 100%. La purificación de las colonias se realizó llevando la bacteria, con la ayuda de una aguja de inoculación tipo asa, a un tubo con 3 ml de agua destilada esterilizada donde se mezcló con un hogenizador para posteriormente transferirla a medio de cultivo AST 100%. Luego se incubó a 28° C por 2-3 días. Este procedimiento se repitió 3 veces hasta lograr un crecimiento bacterial uniforme que fue verificado visualmente. Las bacterias puras fueron almacenadas a 4° C en tubos que contenían medio de agar agua (AA) al 0.6%.

### Caracterización fisiológica de rizobacterias:

**Reacción Gram:** Los aislamientos puros de bacterias de la rizosfera fueron divididos en dos grandes grupos: Gram-positivas y Gram-negativas, utilizando la reacción de Gram (Tinción de Gram y Prueba de solubilidad en KOH 3%).

La tinción de Gram fue determinada colocando una gota de agua destilada estéril en una laminilla limpia, tomando una muestra de la colonia de la bacteria con una aguja de inoculación tipo asa, frotando sobre la gota y distribuyendo la suspensión por toda la laminilla. Se trató de que la distribución fuera uniforme y no se formaran áreas gruesas.

La prueba de solubilidad en KOH fue determinada colocando 1 gota de KOH 3% en una laminilla, añadiendo una aguja de inoculación tipo asa de la bacteria y frotando por 30 segundo. Si se formaba un hilito (si se torna viscoso) la prueba era Gram- y si no se formaba el hilito era Gram+.

### Tinción de esporas:

El aislamiento puro de la rizobacteria se inoculó en medio de AST 100% e incubó a 25° C por 18 horas. Se preparó una laminilla fija con la rizobacteria y se cubrió con papel filtro. Posteriormente, se añadió verde malaquita 5%, calentó hasta que salió humo y dejó reposar 2-3 minutos. Enseguida, se lavó con agua corriente y aplicó safranina al 0.5% durante 30 segundos. La laminilla se lavó de nuevo, secó y observó al microscopio. Las esporas que tiñeron verde son producidas por rizobacterias formadoras de esporas. Mientras, las células vegetales tiñen de rojo.

### Prueba de antibiosis:

La prueba de antibiosis se realizó en medio de agar agua al 15% utilizando círculos de papel filtro estériles impregnados con la suspensión de la bacteria y extracto concentrado de los nematodos. Los nematodos fueron obtenidos de la rizosfera en el platanero, mediante el método combinado de Christlé y Perry. Los círculos de papel impregnados con la bacteria fueron colocados en el extremo del plato Petri y el extracto concentrado de nematodos (2-3 gotas) fué colocado en el centro del mismo. El plato Petri inoculado fué incubado a 25° C por 48 horas, tiempo despues del cual se realizó la observación sobre la supresión o atracción de las bacterias hacia los nematodos.

### Identificación bacterial:

Colonias de bacterias puras Gram-negativas se transfirieron a medio AST 100% e incubaron invertidas a 28°C. Pasadas 24 horas, se identificaron utilizando el Sistema de identificación automatizado de bacterias BIOLOG Micro-Station (Tabla 1).

## RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados indican que no hubo diferencia significativa entre la densidad de la población de bacterias aisladas de la rizosfera de la *Mucuna deeringiana* y el platanero.

Tabla 1. Diversidad de la bacteria de la rizosfera de la *mucuna deeringiana* y el platanero.

CULTIVO	Géneros de Rizobacteria <sup>1</sup>
Mucuna deeringiana	Sphingobacterium thalpophilum Pseudomonas sp. P. putida Pantoea sp.
Platanero	Pseudomonas sp. Alcaligenes paradoxus Serratia marcescens

<sup>1</sup> Corresponde a la identificación de la rizobacteria empleando el Sistema Biolog.

Un total de 17 aislamientos, 10 de la mucuna y 7 de el platanero fueron detectados. La identificación de bacterias por el sistema BIOLOG Micro-Station demostró el aislamiento de un total de 5 géneros, 5 especies (Tabla 1). El 50% de los aislamientos de la mucuna y el 33% de los aislamientos de el platanero se identificaron como miembros del género *Pseudomonas*. Las especies bacterianas aisladas mas frecuentemente en mucuna y en platanero fueron *Pseudomonas spp.* con un 42.8% del total de los géneros de bacterias aisladas. Este resultado esta de acuerdo con la mayoría de los investigadores en el sentido de que *Pseudomonas spp.* son, entre las bacterias, las mas consistentemente abundante en la rizosfera (Curl y Truelove, 1986).

*Pseudomona putida*, una especie de uso potencial en el control biológico de enfermedades (Bruehl, 1987), solo se aisló de la mucuna. Correspondió al 25% de las especies aisladas de la mucuna lo que significa el 14.2% del total de los aislamientos obtenidos de la mucuna y platanero.

Por el contrario, *Serratia marcescens* se aisló únicamente de el platanero. Correspondió al 25% de las especies aisladas del platanero lo que significa el 14.2% del total de los aislamientos obtenidos de la mucuna y platanero. Chet et al. 1991, encontraron en sus estudios que *Serratia marcescens* era un eficiente agente biocontrolador de hongos patogénicos bajo condiciones de invernadero y poseía actividad quinolítica como un mecanismo potencial para control biológico.

Diecisiete aislamientos bacteriales, 10 de mucuna y 7 de platanero, seleccionados al azar de AST 5%, fueron caracterizados utilizando las pruebas de fisiológicas de tinción Gram y solubilidad en KOH 3%. Del total de los aislamientos probados, el 59% fueron Gram-negativas y 41% Gram-positivas (Tabla 2 y 3). Esto indica que la población bacterial de la rizosfera (de mucuna y platanero) esta predominantemente habitada por bacterias Gram-negativas. Las raíces de la mayoría de las plantas están favorecidas por bacterias Gram-negativas, no formadoras de esporas, de forma redondeada cilíndrica. Mientras, que bacterias Gram-positivas, cocos, cilíndricas no formadoras de esporas y aerobicas formadoras de esporas, son relativamente menos abundante (Curl y truelove, 1986).

Tabla 2. Prueba de tinción de Gram de bacterias de la *Mucuna deeringiana* y el *platanero*.

CULTIVO	Gram-negativa	Gram-positiva	Total
<i>Mucuna deeringiana</i>	6	4	10
Platanero	4	3	7
Sub-total	10	7	17

Tabla 3. Prueba de solubilidad en KOH 3% de bacterias de la rizosfera de la *mucuna deeringiana* y el *platanero*.

CULTIVO	KOH -	KOH +	TOTAL
<i>Mucuna deeringiana</i>	6	4	10
Platano	4	3	7
Sub-Total	10	7	17

Siete aislamientos bacteriales Gram-positivos, 4 de *mucuna* y 3 de *platanero*, fueron probados utilizando la tinción de esporas. Se encontró que 2 aislamientos procedentes de la rizosfera de el *platanero* eran formadoras de esporas (Tabla 4). Estas bacterias podrían ser *Bacillus spp.* o *Clostridium spp.* las cuales son resistentes al calor. Esta característica les garantiza un potencial biocontrolador de nematodos ya que pueden fácilmente resistir altas temperaturas (Atlas. 1994).

Tabla 4. Prueba de tinción de esporas de bacterias Gram-positivas de la rizosfera de *mucuna deeringiana* y el *platanero*.

TINCION DE ESPORAS			
CULTIVO	NEGATIVAS	POSITIVAS	TOTAL
<i>Mucuna deeringiana</i>	4	0	4
Platanero	1	2	3
Sub-Total	5	2	7

Cuatro Bacterias Gram-negativas, 2 de *mucuna* y 2 de *platanero*, fueron utilizadas para probar antibiosis hacia nematodos del *platanero*. Los resultados indican que dos de las bacterias procedentes de la rizosfera de el *platanero* e identificadas como Gram-negativas (*Variovorax paradoxus* y *Serratia marcescens*) presentaron un efecto atrayente a nematodos de el *platanero* (Tabla 5). *Serratia marcescens* es un agente biocontrolador eficiente que en forma exitosa suprime el patogeno y reduce incidencia de enfermedades. El antagonismo

bacterial, responsable de el control biológico, podría operar por antibiosis, competencia o parasitismo (Keister y Cregan, 1991).

Los resultados sugieren que bacterias provenientes de la rizosfera de mucuna y platanero podrían estar relacionadas con la supresión o atracción de nematodos y que el aislar y cuantificar componentes de la rizosfera con posibles propiedades antagonistas podrían resultar en una nueva alternativa para el manejo de nematodos en el platanero.

Tabla 5. Prueba de antibiosis de bacterias Gram-negativas de la rizosfera de *mucuna deeringiana* y el *platanero*.

CULTIVO	ANTIBIOSIS		TOTAL
	Negativa	Positiva	
<i>Mucuna deeringiana</i>	2	0	2
Platanero	0	0	2
Sub-Total	2	2	4

## REFERENCIAS

- Acosta, N., O. Román, N. Vicente y L.A. Sanchez. 1991. Sistemas de rotación de cosechas y los niveles poblacionales de nematodos. *J. Agric. Univ. P.R.* 75(4) : 399-405.
- Acosta, N., Vargas, R., Román, O., Vicente, N. y Sanchez, L. 1995. *Mucuna deeringiana* incorporada vs. no incorporada al suelo y rendimiento en siembras subsiguientes de tomate, habichuela y maíz. *J. Agric. Univ. P.R.* 79:65-74.
- Atlas, R.M. 1994. *Principles of microbiology*. Mosby-Year Book, Inc., Missouri, USA. 888 pp.
- Bruehl, G.W. 1987. *Soilborne plant pathogens*. Macmillan Publishing Company. New York USA, 386 pp.
- Chet, I., A. Ordentlich, R. Shapira and A. Oppenheim. 1991. Mechanisms of biocontrol of soil-borne plant pathogens by rhizobacteria. In: *The Rhizosphere and Plant Growth*. Pp. 229-236. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands.
- Cook, R.J. and K.F. Baker. 1983. *The Nature and Practice of Biological Control*. E.A. Y.B. Truelove. 1986. *The Rhizosphere*. Springer-Verlag, New York, USA, 288 pp.
- Giebel, J. 1982. Mechanism of resistance to plant nematodes. *Ann. Rev. Phytopathology* 20:257-259.
- Kloepper, J.W., R.M. Zablotowicz, E.M. Tipping and R. Lifshitz. 1991. Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. In: *The Rhizosphere and Plant Growth*. Pp 229-236. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands.
- Lucas, G.B. 1986. Plant parasitic nematodes that attack tobacco. In: *Plant parasitic nematodes of bananas, citrus, grapes, and tobacco*. Union Carbide. 59-60 pp.
- National Academy of Sciences. 1968. *Principles of Plant and Animal Pest Control*. Vol.4 (Control of Plant-Parasitic Nematodes). Washington, D.C. 172 pp.
- Rodriguez-Kabana, R., and G. Morgan-Jones, 1988. Potential for nematode control by mycofloras endemic in the tropics. *Journal of Nematology* 20, 191-203.

- Román, J. 1978. Fitonematología tropical. Universidad de P.R., RUM, Colegio de Ciencias Agrícolas, Estación Experimental Agrícola, Río Piedras, P.R. 256 pp.
- Southey, J.F. 1978. Physical methods of control. Plant Nematology. ADAS Plant Pathology Laboratory, Harpenden, London, 98-111 pp.
- Stirling, G.R. 1991. Biological Control of Plant Parasitic Nematodes, Progress, Problems, and Prospects. CAB International. Brisbane, Australia, 282 pp.
- Taylor, A.L. y J.N. Sasser. 1983. Biología, identificación y control de los nematodos de nodulos de la raíz. 1-50 pp.
- Van Gundy S.D. 1985. Biological control of nematodes: Status and Prospects in Agricultural IPM Systems. In: Biological Control in Agricultural IPM Systems. Academic Press. 467-478 pp.
- Vargas, R. 1995. Nematode population dynamics and microbial ecology in a rotation program with *Mucuna deeringiana*, and other crops: A biological approach. Ph.D Thesis, Auburn University, Alabama, USA, 128 pp.
- Vargas, R. y N. Acosta. 1990. *Pasteuria penetrans*: Agente biorrepresor de nematodos en Puerto Rico. J. Agric. Univ. P.R. 74:319-321.
- Vargas, R. R., Rodriguez-Kabana, J.W. Kloepper. 1994. Effect of velvetbean on populations of plant-parasitic nematodes and soil and rhizosphere microflora. *Nematropica* 24 (2) : 94.
- Vicente, N.E., and Acosta, N. 1987. Effects of *Mucuna deeringiana* on *Meloidogyne incognita*. *Nematropica* 17:99-102.
- Zabaleta-Mejia, E. 1985. The effect of soil bacteria on *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood infection. Dissertation Abstracts International 46, 1018-B.
- Zuckerman, B.M., R.A. Rhode. 1981. Plant Parasitic Nematodes. Vol. III. Academic Press, Inc. New York, 508 pp.