

**Comparación de efectos de seis cepas
Lysobacter enzymogenes y su actividad
antagónica para el control de *Bipolaris
sorokiniana***

Mercedes Elizabeth Telenchana Telenchana

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2013

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Comparación de efectos de seis cepas *Lysobacter enzymogenes* y su actividad antagónica para el control de *Bipolaris sorokiniana*

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniero Agrónomo en el Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Mercedes Elizabeth Telenchana Telenchana

Honduras
Noviembre, 2013

Comparación de efectos de seis cepas *Lysobacter enzymogenes* y su actividad antagónica para el control de *Bipolaris sorokiniana*

Mercedes Elizabeth Telenchana Telenchana

Resumen. El estudio se realizó en el departamento de fitopatología de la Universidad de Nebraska- Lincoln, Estados Unidos. Los objetivos fueron determinar los efectos de seis cepas *Lysobacter enzymogenes* durante la germinación *in vitro* de las semillas de soya y trigo. Evaluar la efectividad de las cepas *Lysobacter enzymogenes* para el control de la pudrición de la raíz en trigo causada por ataque del hongo *Bipolaris sorokiniana*.

El ensayo tuvo dos fases, la primera se realizó en el laboratorio donde se evaluaron los efectos producidos por las cepas *Lysobacter* spp. durante la germinación *in vitro* de las semillas de soya y trigo. La siguiente fase se realizó en el invernadero donde se evaluó la actividad antagónica de las cepas bacterianas sobre el hongo *Bipolaris sorokiniana* en las semillas de trigo. Se usó un diseño completamente al azar, cuatro réplicas y 25 semillas por cada réplica. Las medias se separaron con la prueba Duncan ($P \leq 0.05$).

Las semillas de soya inoculadas en el laboratorio con las seis cepas de *Lysobacter* spp. presentaron diferencias significativas al producir una disminución en la velocidad de germinación a diferencia de las cepas OH11, U4 y 64A que tuvieron igual velocidad que las semillas sin inocular. En la germinación total se observó diferencias significativas, en especial de la cepa 48B3 con 89% de germinación en comparación a las cepas OH11 y 64A con 98 y 99% respectivamente. Todas las semillas de soya inoculadas con las cepas *Lysobacter* presentaron necrosis sobre las raíces y cotiledones pero con mayor severidad las semillas inoculadas con las cepas N4-7 y 48B2. En el ensayo de germinación *in vitro* de las semillas de trigo inoculadas con las cepas bacterianas se observó una reducción en la velocidad y porcentaje de germinación a diferencia de la cepa 64A que tuvo igual velocidad a las semillas sin inocular. Las cepas bacterianas produjeron la inhibición de las raíces de trigo mayormente en las semillas inoculadas con las cepas C3R5, OH11, N4-7 y 48B3. Para el ensayo bajo invernadero no se observó ningún efecto de las cepas *Lysobacter enzymogenes* sobre el hongo *Bipolaris sorokiniana* debido a que la incidencia de la pudrición de la raíz de trigo causada por el hongo no fue significativa.

Palabras clave: Bacterias, enzimas líticas, hongos.

Abstract. The study was conducted in the department of plant pathology at the University of Nebraska- Lincoln the United States. The objectives of this study were to determine the effects of six strains of *Lysobacter enzymogenes* during *in vitro* germination of soybean and wheat seeds. And to evaluate the effectiveness of *Lysobacter enzymogenes* strains for control of root rot on wheat caused by the *Bipolaris sorokiniana* fungus.

The trial had two stages; the first was conducted in the laboratory which was evaluated the effects *Lysobacter* spp. strains during *in vitro* germination of soybean and wheat seeds. The next stage was conducted in the greenhouse where they were the antagonistic activity of the bacterial strains was evaluated under the *Bipolaris sorokiniana* fungus in wheat

seeds. We used a completely randomized design, four replications and 25 seeds per replication. Means were separated by Duncan test ($P \leq 0.05$).

Soybean seeds inoculated with six *Lysobacter* spp. strains in the laboratory had significant differences to produce a decreased germination rate unlike strains OH11, U4 and 64A that had the same speed as non-inoculated seeds. In the germination significant differences was observed especially the 48B3 strain with 89% germination compared to strains with OH11, 64A with 98 and 99% respectively. Also, soybean seeds inoculated with *Lysobacter* strains showed necrosis on the roots and cotyledons but it was more severe in seeds inoculated with N4-7 and 48B3 strains. Testing *in vitro* germination of wheat seeds inoculated with the bacterial strains a reduction in speed and percentage of germination was determined unlike the 64A strain that had the same speed germination as non-inoculated seeds. Bacterial strains produced inhibition of wheat roots, mainly in the seeds inoculated with C3R5, OH11, N4-7 and 48B3 strains. For the greenhouse test there was no effect observed as a cause of *Lysobacter enzymogenes* strains under the fungus *Bipolaris sorokiniana* because the incidence of root rot of wheat caused by the fungus was not significant.

Keywords: Bacteria, fungi, lytic enzymes.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	v
Índice de cuadros, figuras y anexos.....	vi
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	9
4 CONCLUSIONES	12
5 RECOMENDACIONES	13
6 LITERATURA CITADA.....	14
7 ANEXOS	16

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Efectos de seis cepas de <i>Lysobacter enzymogenes</i> en la germinación <i>in vitro</i> de las semillas de soya, variedad Williams 82, cinco días después de la siembra bajo condiciones de laboratorio.	9
2. Efectos de seis cepas de <i>Lysobacter enzymogenes</i> en la germinación <i>in vitro</i> de las semillas de trigo, variedad “Russ Hard Spring”, cinco días después de la siembra bajo condiciones de laboratorio.....	10
3. Evaluación de la efectividad de las seis cepas <i>Lysobacter enzymogenes</i> inoculadas en las semillas de trigo para el control de la pudrición de la raíz en trigo causada por el ataque del hongo <i>Bipolaris sorokiniana</i> infectado en el suelo.	11
Figuras	Página
1. Dibujo mostrando el proceso de diluciones seriadas de las cepas <i>Lysobacter enzymogenes</i> inoculadas en las semillas de soya y trigo.	5
2. Cultivo de diluciones seriadas de las semillas inoculadas con las cepas de <i>Lysobacter enzymogenes</i> en el medio 10% TSA.....	6
3. Escala de necrosis en germinación <i>in vitro</i> de semillas de soya inoculadas con cepas de <i>Lysobacter enzymogene</i>	7
4. Escala de necrosis en mesocotilo del trigo (ubicado entre la raíz y el nudo de ahijamiento)	8
Anexos	Página
1. Concentración de las cepas bacterianas de <i>Lysobacter enzymogenes</i> usadas en semillas de soya (williams 82).....	16
2. Concentración de las cepas bacterianas de <i>Lysobacter enzymogenes</i> usadas en semillas de trigo (Harvested 2000).	17
3. Semillas de soya y trigo inoculadas con las cepas <i>Lysobacter enzymogenes</i>	18

1. INTRODUCCIÓN

La resistencia de ciertas plagas y enfermedades en las plantas al igual que la contribución en la contaminación ambiental, han sido generadas por el uso indiscriminado de productos agroquímicos en la agricultura. Esto ha generado la búsqueda de nuevas opciones para el control de plagas y enfermedades en las plantas donde se ha destacado como una alternativa el tema de control biológico (McSpadden Gardener 2002).

El término control biológico se ha utilizado en diferentes campos de la biología, especialmente entomología y fitopatología. En entomología, se ha utilizado para describir el uso de insectos vivos depredadores, nematodos entomopatógenos, o patógenos microbianos para suprimir las poblaciones de diferentes plagas de insectos. En patología de las plantas, el término se aplica a la utilización de antagonistas microbianos para suprimir enfermedades, así como el uso de patógenos específicos para controlar las poblaciones de malezas. En ambos campos el organismo que suprime la plaga o patógeno se conoce como el agente de control biológico (Pal y McSpadden 2006).

Cuando revisamos la literatura sobre control biológico de las enfermedades en las plantas usando bacterias como controladores biológicos, podemos encontrar información principalmente sobre cepas del género *Agrobacterium*, *Bacillus* y *Pseudomonas*. Sin embargo, cada vez se incrementan las opciones de especies bacterianas como agentes de control y entre éstas ha resaltado la presencia de bacterias del género *Lysobacter* por su importancia ecológica y potencial como controlador biológico de hongos, bacterias y nematodos (Li *et al* 2008).

Lysobacter enzymogenes es una mixobacteria del género *Lysobacter* que pertenece a la familia Xanthomonadaceae y orden Xantomonadales. Poseen características únicas como su motilidad deslizante (sin flagelo) en la ecología del suelo que es poco conocida, alta guanina y citosina que generalmente oscilan entre 62 a 72%, variable de longitud celular de 2-70mm y 28°C como óptima temperatura de crecimiento(Christensen, P; Cook, FD. 1978). Su medio de Biocontrol es la producción y secreción de abundantes enzimas extracelulares líticas como proteasas, quitinasas, glucanasas, lipasas y fosfolipasas que se encargan de degradar la pared celular de hongos fitopatógenos. El primer grupo enzimático estudiado para actividades de biocontrol fueron las proteasas que participan en contra de los nematodos. Sin embargo, ciertos estudios muestran que las proteasas también son activas contra algunas bacterias gram-positivos y gram-negativos por lo que aún se estudia como un importante mecanismo de control biológico (Tofazzal Islam, M. 2011)

Estudios realizados con *Lysobacter* han generado tres áreas principales de amplia investigación, como son: el uso como agentes de control biológico de enfermedades de las plantas, la producción de antibióticos para la medicina humana y enzimas para aplicaciones comerciales. Las cepas de *Lysobacter* spp. tienen un amplio espectro de antagonismo *in vitro* contra bacterias, hongos, algas unicelulares y nematodos. Las enfermedades controladas por las cepas es muy amplia y *L. enzymogenes* ha sido reportado como una de las cepas efectivas de control biológico en comparación a otras especies a través del tiempo (Li *et al.* 2008).

En la actualidad existe una amplia gama de cepas de *Lysobacter enzymogenes* que han sido identificadas pero pocas de éstas han sido probadas como efectivas en control biológico (Palumbo *et al.* 2005) Especies como *Lysobacter enzymogenes* cepa C3 ha sido estudiada a profundidad y ha demostrado ser un efectivo controlador biológico del hongo *Bipolaris sorokiniana* que es el agente causal de enfermedades en la raíz, hojas y plántulas del trigo y cebada al igual que *Pythium ultimum* que causa marchitamiento fúngico en remolacha azucarera. Sin embargo, aún se desconoce los efectos que pueden causar el uso de la bacterias *Lysobacter enzymogenes* en aplicaciones directas a las semillas (Kilic Ekici y Yuen 2003).

Los objetivos de este estudio fueron:

- Evaluar los efectos de seis cepas *Lysobacter enzymogenes* reportadas como controladores biológicos en la germinación de las semillas de soya y trigo.
- Evaluar la efectividad de las cepas *Lysobacter enzymogenes* en el control de la pudrición de la raíz en trigo causada por ataque del hongo *Bipolaris sorokiniana*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el Laboratorio de Control Biológico del Departamento de Fitopatología de la Universidad de Nebraska-Lincoln, situada en el estado de Nebraska, Estados Unidos.

MATERIALES

Cepas bacterianas y condiciones de cultivo. Las cepas usadas de *Lysobacter enzymogenes*, fueron: 1. C3R5 de Mead, Nebraska, 2. OH11 de China, 3. N4-7 de New Jersey, 4. 48B3 de Scottsbluff, Nebraska y 5. U4 de la Universidad de California-Davis.

Todas las cepas bacterianas forman parte de la colección del laboratorio del Doctor Gary Yuen, Universidad de Nebraska-Estados Unidos, almacenadas a -75 °C.

El medio usado para el cultivo de las cepas fue 10% TSA (Agar Tripticasa Soya), incubadas a 28 °C por dos días antes de ser usadas en el ensayo.

Variedad de semillas evaluadas

Soya: Williams 82

Trigo de primavera: Russ Hard Spring

METODOLOGÍA

El ensayo tuvo dos fases, la primera se realizó en el laboratorio donde se evaluó el efecto de las cepas de *Lysobacter spp.* en la germinación *in vitro* de las semillas de soya y trigo, la otra parte fue en el invernadero donde se evaluó el efecto de las seis cepas sobre el hongo *Bipolaris sorokiniana* en el suelo.

Fase de laboratorio

A continuación se detalla el procedimiento que utilizó para cada cepa de *Lysobacter spp.* sobre las semillas de soya y trigo.

Esterilización de las semillas. Se pesaron las semillas de soya (120 g) y trigo (6 g), luego se colocaron dentro de un beaker de 500 mL por separado, se añadió una solución de 100mL de agua y cloro al 5% y ligeramente se agitó el beaker con las semillas y la solución durante 4 minutos. Posteriormente se enjuagó con agua destilada dos veces y luego se colocaron las semillas sobre papel absorbente esterilizado en la cámara de flujo laminar para que quedaran secas por completo.

Recubrimiento de semillas con metilcelulosa. Se colocaron las semillas esterilizadas dentro de platos Petri de 150×15 mm y se añadió con una pipeta 4 mL de metilcelulosa al 2% que es una solución acuosa y un agente suspensor que permite que las bacterias en solución puedan adherirse a las semillas y proteger a las cepas bacterianas después de que el metilcelulosa se haya secado.

De cada cepa se usaron dos platos de cultivos bacteriales y dentro de los platos se colocaron 6 mL de Buffer Fosfato y con la ayuda de una espátula plástica esterilizada se mezcló suavemente, luego se incorporó 4 mL de la suspensión total con una pipeta dentro de la solución de metilcelulosa contenida en el plato petri con semillas.

Los platos se sellaron con parafina y se sacudió cada plato hasta que todas las semillas quedaron totalmente cubiertas por la bacteria. Después se abrieron los platos y se colocaron en la cámara de flujo laminar para permitir que las semillas se sequen. Una vez secas las semillas se descartaron aquellas que sufrieron algún daño durante el proceso, luego se colocaron 25 semillas dentro de platos petri plásticos de 10 × 150 mm que contenían dos papeles filtros circulares y esterilizados de 10 × 100 mm. Se añadió 4 mL de agua destilada dentro de cada plato petri y se colocaron todos los platos con semillas dentro de una incubadora a 26°C sin luz hasta que la mayor parte de las semillas germinaron. Sin embargo, a partir del día tres se inició con el conteo de semillas germinadas y las observaciones de algún efecto que pueda ocurrir durante el tiempo de germinación.

Series de dilución para las semillas recubiertas con metilcelulosa. Este procedimiento se utilizó para conocer las concentraciones de las bacterias en los dos tipos de semillas después de ser inoculadas con las bacterias. Se usó la “Técnica de frecuencia de dilución en placa para el ensayo de la ecología microbiana” (Harris, R y L, Sommers, 1968) basado en el concepto de “número más probable”. Esta técnica consiste en inocular réplicas de micro muestras a partir de cada miembro de una serie de dilución sobre las áreas delineadas en placas de medio sólido que se incuban y la aparición de crecimiento o transformación bioquímica específica se registra para cada área inoculada. El conteo del crecimiento microbiano se llevó a cabo mediante la observación del crecimiento bacterial sobre las placas de medio sólido. Para este ensayo, los resultados de las poblaciones microbianas obtenidas del conteo bacterial, se registraron en la plantilla de excel.

El proceso de series de dilución para las semillas recubiertas con metilcelulosa se inició con la preparación de las diluciones bacteriales o diluciones cero. Dentro de un micro tubo eppendorf de 2 mL, se colocaron 900 µL de Fosfato buffer para diluciones con coloración azul y las semillas recubiertas con metilcelulosa (dos semillas de soya o cuatro semillas para trigo por tubo). Se dejó reposar de 15 a 20 minutos para que el metilcelulosa se disuelva, luego se colocó la micro centrífuga sobre un agitador vortex durante 15

segundos para disolver por completo la dilución. El procedimiento se repitió una vez más, de manera que se obtuvo dos réplicas de cada cepa de *Lysobacter* que se usó para inocular las semillas, después se continuó con la preparación de las diluciones seriales.

Se realizaron once diluciones de cada réplica de las cepa de *Lysobacter*, para lo cual se utilizó una caja con tubos de micro diluciones de 500 μL , los cuales fueron llenados con 450 μL de Fosfato buffer color azul cada uno, usando una multi pipeta de ocho canales. Luego se transfirieron individualmente 50 μL de las diluciones cero (tubos de 2 mL con semillas y fosfato buffer) al correspondiente tubo de dilución número uno. Cuando todos los 50 μL fueron transferidos a la primera línea de los tubos de dilución uno, se realizó la dilución serial con una multi pipeta de ocho canales, transfiriendo 50 μL de la dilución uno a la siguiente línea con tubos de dilución dos, luego a la dilución tres, hasta que fueron completadas las once diluciones (Figura 1).

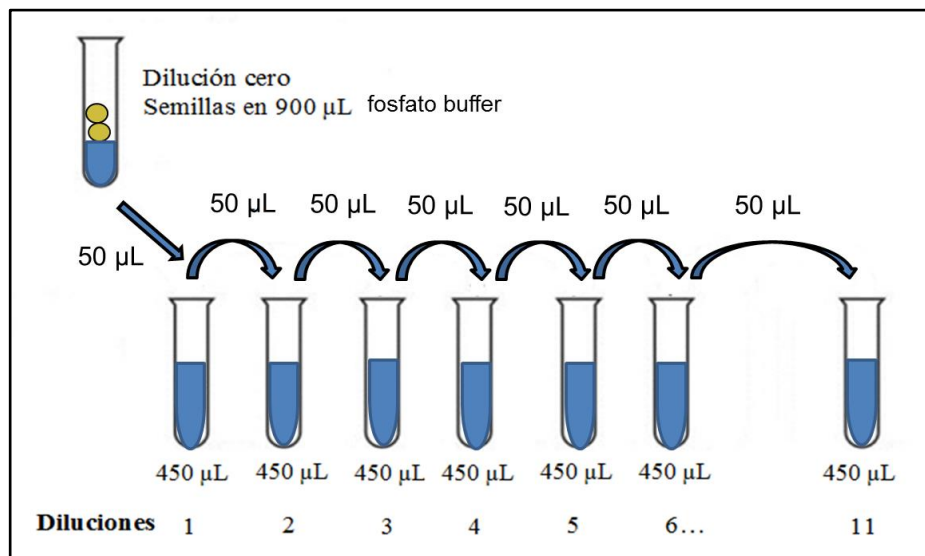


Figura 1. Dibujo mostrando el proceso de diluciones seriadas de las cepas *Lysobacter enzymogenes* inoculadas en las semillas de soya y trigo.

Posteriormente, se colocaron las diluciones en el medio de 10% TSA (Agar Tripticasa Soya y tomando como referencia el rayado de cuatro partes iguales sobre la base de los platos petri se colocaron sobre el medio de cultivo ocho puntos de 10 μL de las correspondientes diluciones bacteriales en cada división y después de finalizar con todas las diluciones se colocaron los platos en la incubadora a 28 $^{\circ}\text{C}$ para permitir el crecimiento de la bacteria.

Al tercer día se contaron las respuestas positivas, es decir los puntos azules que se pudieron observar ya sea completamente circulares o simplemente un punto pequeño. Los datos se ingresaron en una tabla de excel para la estimación del número más probable de la bacteria *Lysobacter* spp. (Anexo 1). Este procedimiento se realizó para los dos tipos de semilla (Figura 2).

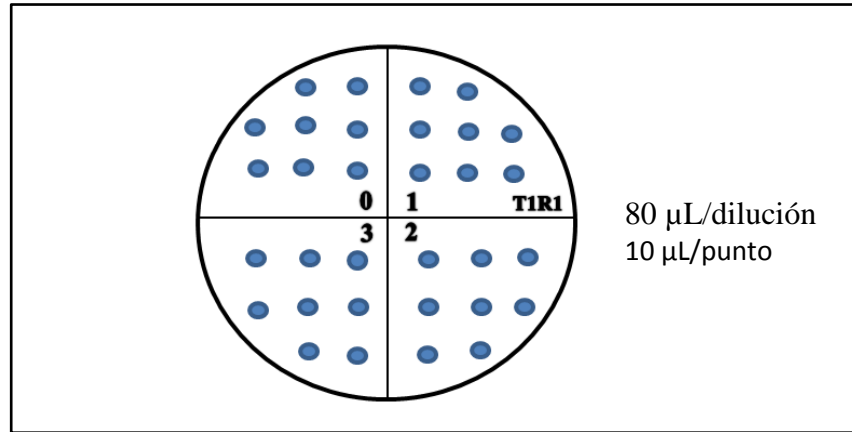


Figura 2. Cultivo de diluciones seriadas de las semillas inoculadas con las cepas de *Lysobacter enzymogenes* en el medio 10% TSA.

METODOLOGÍA EN INVERNADERO

Se inocularon las semillas de trigo con cada cepa cepas de *Lysobacter* spp bacteriana utilizando el método de recubrimiento de semillas con metilcelulosa. Se llenaron macetas de 4 pulgadas con 250 mL de suelo orgánico (una parte de tierra, una parte de turba y una parte de vermiculita), luego se humedeció con agua y se colocaron las respectivas etiquetas de plástico de 1,2 x 10 cm para identificar cada maceta. A continuación, se colocaron dentro de cada maceta 25 semillas de trigo que fueron previamente inoculadas con las cepas bacterianas. Después de la siembra se añadió sobre cada maceta 150 mL de suelo inoculado con el hongo *Bipolaris sorokiniana* y 60 mL de agua. Las plantas se mantuvieron durante 25 días en crecimiento bajo invernadero y el riego se inició dos días después de la siembra por la mañana y tarde con una pistola multichorro.

VARIABLES EVALUADAS EN ENSAYOS DE LABORATORIO

Porcentaje de Germinación. Para determinar el porcentaje de germinación o capacidad germinativa se contaron todas las semillas germinadas por tratamiento cinco días después de la siembra en los platos petri. Para efectos prácticos se consideró que una semilla ha germinado cuando ha emergido de la semilla una radícula de al menos 2 cm de longitud. Para su cálculo se aplicó la siguiente fórmula [1]:

$$PG = \frac{GA}{TS} \times 100 \quad [1]$$

Donde:

PG: Porcentaje de germinación (%).

GA: Germinación acumulada hasta el último día de evaluación.

TS: Total de semillas sembradas.

Índice de velocidad de germinación. El índice está definido como la relación de número de semillas germinadas con el tiempo de germinación por lo que, cuanto mayor sea el valor calculado, mayor habrá sido la velocidad a la que ocurrió la germinación de semillas. Para su cálculo se aplicó la siguiente fórmula [2]:

$$IVG = \frac{P1}{T1} + \frac{P2}{T2} + \dots + \frac{Pn}{Tn} \quad [2]$$

Donde:

P: Número de semillas germinadas

T: Tiempo en que germinaron

n: día del último control

Severidad de necrosis en semillas de soya: De cada réplica se realizó el conteo de las semillas con diferente grado de necrosis usando la siguiente escala:



Figura 3. Escala de necrosis en germinación *in vitro* de semillas de soya inoculadas con cepas de *Lysobacter enzymogenes*. 1. Lesión leve o no hay necrosis 2. Moderada 3. Severo o totalmente necrótico.

VARIABLES EVALUADAS EN ENSAYO BAJO INVERNADERO

La toma de datos finales se realizó a los 25 días después de la siembra. Se tomó como referencia los resultados del conteo de las manchas negras a nivel foliar del trigo de cada maceta ocasionada por el hongo *Bipolaris sorokiniana*, ésta actividad se realizó cada diez días para determinar si había algún incremento de la enfermedad.

Severidad de necrosis en mesocotilo del trigo. Se lavó las raíces a bajo caudal para evitar el daño de las mismas. Se observó la necrosis en los entrenudos localizados entre la corona de la raíz del trigo y el tallo, mediante el uso de una escala (Fig 4)



Figura 4. Escala de necrosis en mesocotilo del trigo (ubicado entre la raíz y el nudo de ahijamiento) 1. No hay lesiones 2. Las lesiones cubren menos del 10% de los entrenudos 3. Las lesiones cubren menos del 10-25% de los entrenudos 4. Las lesiones cubren del 25-50% de los entrenudos 5. Las lesiones cubren 50-99% de los entrenudos 6. Las lesiones cubren el 100% de los entrenudos

Peso foliar seco. Las hojas de las plantas de cada maceta se cortaron a 0.5 cm de la corona de la raíz con la ayuda de tijeras para podar y luego se colocaron dentro de bolsas de papel, de manera que una bolsa contenía las plantas de una maceta. Posteriormente, se colocaron las bolsas dentro de un horno a 50°C alrededor de 12 horas y luego se pesó las hojas de cada bolsa con una balanza digital.

Tamaño del experimento. El número de tratamientos que se emplearon en los experimentos de laboratorio e invernadero fueron seis con el tratamiento de control, con cuatro repeticiones por tratamiento y cada repetición con 25 semillas (trigo o soya)

Diseño experimental y análisis estadístico. Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) con cuatro repeticiones por cada tratamiento para los ensayos en laboratorio e invernadero. También se realizó un Análisis de Varianza (ANDEVA) con separación de medias utilizando la prueba de rango múltiple Duncan con un modelo lineal (GLM), a un nivel de significancia de $P \leq 0.05$, con el programa “Sistema de Análisis Estadístico versión 9.3 (SAS)”.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fase de laboratorio

Los datos obtenidos para el índice de velocidad de germinación en la semilla de soya fueron significativamente diferentes ($P < 0.05$). Sin embargo los resultados demuestran que las semillas de soya inoculadas con la cepa *Lysobacter enzymogenes* 64A alcanzó mayor velocidad de germinación al igual que las semillas sin inocular que corresponden al tratamiento de control y los tratamientos OH11 y U4. También, la cepa 64A obtuvo el mayor número de semillas totales germinadas con un 99% pero no fue significativamente mayor que las semillas inoculadas con las cepas C3R5, OH11, N4-7, U4 y el tratamiento de control. Los resultados de porcentaje acumulado de germinación obtenidos después de cinco días muestran que todos los tratamientos excepto la cepa 48B3 tuvieron una germinación de las semillas de soya mayor o igual a 95%. Al evaluar las semillas de soya se observó un efecto necrótico mayor en todas las semillas inoculadas con las diferentes cepas bacterianas a diferencia de las semillas sin inocular con las bacterias que presentaron un 95% en la escala uno que representa a las lesiones leves o sin necrosis. En la escala tres que corresponde a daño severo o totalmente necrótico las cepas N4-7 y 48B3 no fueron diferentes entre sí ($P > 0.05$) y obtuvieron el mayor porcentaje de necrosis con 47 y 57% de necrosis, respectivamente. (Cuadro 1)

Cuadro 1. Efectos de seis cepas de *Lysobacter enzymogenes* en la germinación *in vitro* de las semillas de soya, variedad Williams 82, cinco días después de la siembra bajo condiciones de laboratorio.

Cepa bacteriana	Índice de velocidad de germinación	Germinación (%)	Severidad de necrosis (%)		
			1	2	3
C3R5	11.46 bc ^w	95 ab	36 d	43 a	21 b
OH11	12.31 ab	98 a	36 d	46 a	18 b
N4-7	10.83 c	93 ab	13 e	40 ab	47 a
48B3	10.55 c	89 b	9 e	34 ab	57 a
U4	12.41 ab	95 ab	68 c	25 bc	7 b
64A	12.76 a	99 a	81 b	15 cd	4 b
Control	12.86 a	96 ab	95 a	5 d	0 b

^wMedias con letras comunes en la misma columna no difieren significativamente según la separación de medias de la prueba Duncan ($P \leq 0.05$).

El efecto de las cepas de *Lysobacter enzymogenes* en las semillas de trigo, los datos obtenidos para el índice de velocidad de germinación durante los primeros cinco días, fueron significativamente diferentes ($P < 0.05$), las semillas de trigo inoculadas con la cepa 64A alcanzaron la mayor velocidad de germinación (17.85) en comparación a las demás cepas, también obtuvo el mayor número de semillas totales germinadas con un 97% igual al tratamiento de control sin inocular. Al evaluar la elongación de las raíces de trigo se mostró que las semillas inoculadas con la bacteria presentaron menor elongación significativamente que el tratamiento testigo sin tratar. De los tratamientos inoculados se observó que las semillas inoculadas con la cepa 64A presentaron mayor elongación seguida por la cepa U4. Sin embargo, no se encontró diferencias significativas entre las semillas tratadas con las cepas C3R5, OH11, N4-7 y 48 B3 (Cuadro 2).

Según Li *et al.* (2008), la aplicación de las células C3 a semillas de trigo reduce significativamente la longitud de la raíz de las plántulas, mientras que otras cepas de *Lysobacter enzymogenes* no tienen el mismo efecto. Estos hallazgos sugieren que la inhibición de crecimiento de las raíces causado por la cepa C3 es debido a un factor específico en lugar de un número elevado de células o metabolitos secundarios generales. Sin embargo en este estudio se pudo observar que este efecto presentaron todas las semillas inoculadas con las diferentes cepas pero en diferente proporción.

Cuadro 2. Efectos de seis cepas de *Lysobacter enzymogenes* en la germinación *in vitro* de las semillas de trigo, variedad “Russ Hard Spring”, cinco días después de la siembra bajo condiciones de laboratorio.

Cepa bacteriana	Índice de velocidad de germinación	Germinación (%)	Elongación de raíz (cm)
C3R5	9.72 bc ^w	60 cde	2.97 d
OH11	7.55 c	49 de	3.32 d
N4-7	7.25 c	45 e	2.57 d
48B3	10.30 bc	64 cd	3.17 d
U4	11.90 b	78 bc	5.52 c
64A	17.85 a	97 a	7.20 b
Control	16.56 a	90 ab	10.4 a

^wMedias con letras comunes en la misma columna no difieren significativamente según la separación de medias de la prueba Duncan ($P \leq 0.05$).

Fase de invernadero

Al evaluar las plantas de trigo a los 25 días después de la siembra, no se observó diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$) sobre las variables de severidad de necrosis en mesocotilo del trigo y en el peso foliar. Este resultado pudo haber sido ocasionado debido a que es el agente causal (*Bipolaris sorokiniana*) no tenía la concentración adecuada para poder producir enfermedades en la raíz, especialmente en el

mesocotilo del trigo. Otra de las posibles causas pudo haber sido por la pequeña cantidad que fue colocado únicamente en la superficie de las macetas. Así como también se puede atribuir al poco tiempo (25 días) que duró el ensayo para evaluación del desarrollo de la enfermedad.

Cuadro 3. Evaluación de la efectividad de las seis cepas *Lysobacter enzymogenes* inoculadas en las semillas de trigo para el control de la pudrición de la raíz en trigo causada por el ataque del hongo *Bipolaris sorokiniana* infectado en el suelo.

Cepa bacteriana	Necrosis de raíz (%)	Peso seco foliar (g)
C3R5	10.75	3.35
OH11	8.75	3.05
N4-7	6.00	2.90
48B3	4.00	2.99
U4	6.25	3.49
64A	5.50	3.20
Control	6.50	2.65

4. CONCLUSIONES

- Las seis cepas *Lysobacter* spp. no aceleraron la velocidad de germinación *in vitro* de las semillas de soya y trigo debido a que presentaron igual velocidad en comparación a las semillas sin inocular.
- Se determinó que las bacterias *Lysobacter enzymogenes* producen el efecto de necrosis en las raíces y cotiledones de las semillas de soya al igual que la inhibición de las raíces en las semillas de trigo.
- En el ensayo bajo invernadero no se observó ningún efecto de las cepas *Lysobacter enzymogenes* sobre el hongo *Bipolaris sorokiniana* debido a que la incidencia de la pudrición de la raíz en trigo no fue significativa.

5. RECOMENDACIONES

- Realizar más estudios en laboratorio sobre los efectos de necrosis en las semillas de soya y la inhibición de las raíces en las semillas de trigo con la intención de reforzar los resultados obtenidos y determinar las causas de estos efectos.
- Evaluar la elongación de las raíces de trigo en ensayos bajo invernadero pero utilizar un tipo de suelo que permita el fácil desprendimiento de las raíces.
- Evaluar el efecto antagónico de las bacterias *Lysobacter enzymogenes* sobre el hongo *Bipolaris Sorokiniana* en el laboratorio.
- Para la evaluación de control biológico de *Bipolaris sorokiniana* por las bacterias *Lysobacter* spp., dejar el cultivo establecido por más de 25 días que se usaron en este estudio y además evaluar la infestación del hongo antes y durante el ensayo.

6. LITERATURA CITADA

Agriculture and Development. 2001. Common Root Rot, Seedling Blight, Damping-Off (en línea). Alberta.ca. Consultado 2 may. 2013. Disponible en [http://www1.agric.gov.ab.ca/\\$department/deptdocs.nsf/all/prm2394](http://www1.agric.gov.ab.ca/$department/deptdocs.nsf/all/prm2394)

Christensen, P; Cook, FD. 1978. *Lysobacter*, a New Genus of Nonfruiting, Gliding Bacteria with a High Base Ratio (en línea). USA. IJSEM (International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology). Consultado el 01 jun. 2013. Disponible en <http://ijs.sgmjournals.org/content/28/3/367.full.pdf+html?sid=974c5017-f55b-44c7-aafe-2c577400b140>

Kilic Ekici, O; Yuen, GY. 2003. Induced Resistance as a Mechanism of Biological Control by *Lysobacter enzymogenes* Strain (en línea). Lincoln, Nebraska, Estados Unidos. AGORA (Access to Global Online Research in Agriculture). Consultado el 12 may. 2013. Disponible en <http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO.2003.93.9.1103>

Li, S; Jochum, CC; Yu, F; Zaleta Rivera, K; Du, L; Harris, SD; Yuen, GY. 2008. An Antibiotic Complex from *Lysobacter enzymogenes* Strain C3: Antimicrobial Activity and Role in Plant Disease Control (en línea). Lincoln, Nebraska, Estados Unidos. AGORA (Access to Global Online Research in Agriculture). Consultado el 12 may. 2013. Disponible en <http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO-98-6-0695>

McSpadden Gardener, BB. 2002. Biological Control of Plant Pathogens: Research, Commercialization, and Application in the USA (en línea). PMN (Plant Management Network). Consultado el 10 may. 2013. Disponible en <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/review/biocontrol/>

Pal, KK; McSpadden Gardener, B. 2006. Biological Control of Plant Pathogens (en línea). APSnet. Consultado el 10 may. 2013. Disponible en <http://www.apsnet.org/edcenter/advanced/topics/Pages/BiologicalControl.aspx>

Palumbo, JD; Yuen, GY; Jochum, CC; Tatum, K; Kobayashi, DY. 2005. Mutagenesis of β -1,3-Glucanase Genes in *Lysobacter enzymogenes* Strain C3 Results in Reduced Biological Control Activity Toward Bipolaris Leaf Spot of Tall Fescue and Pythium Damping-Off of Sugar Beet (en línea). Lincoln, Nebraska, Estados Unidos. AGORA

(Access to Global Online Research in Agriculture). Consultado el 12 may. 2013. Disponible en <http://naldc.nal.usda.gov/download/2226/PDF>

Tofazzal Islam, M. 2011. Plant Growth Responses: Potentials for Biological Control of Plant Diseases by *Lysobacter* spp., with Special Reference to Strain SB-K88. Ed. DK Maheshwari. Gazipur, Bangladesh. Publisher Springer Berlin Heidelberg. p. 335-363

Harris, RF; Sommers, LE. 1968. Plate-Dilution Frequency Technique for Assay of Microbial Ecology (en línea). Wisconsin, Estados Unidos. American Society for Microbiology. Consultado el 01 jun. 2013. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC547406/pdf/applmicro00238-0146.pdf>

7. ANEXOS

Anexo 1. Concentración de las cepas bacterianas de *Lysobacter enzymogenes* usadas en semillas de soya (williams 82).

Effect of *Lysobacter* root growth inhibitor compound on germination of soybean (Williams 82) seed

Test 2

Investigator: Mercedes Telenchana

Date planted: April 3

Date counted: April 6

Treatment	Rep	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Total 0-5	Total 1-6	Total 2-7	Total 3-8	Total 4-9	Total 5-10	Total 6-11	CFU/mL	Buffer volume (ml)	CFU/2seed	CFU/seed	Ttr means
T1	1	8	8	8	8	1	0	0	0	0	0	0	0	48	41	33	25	17	9	1	2.45E+07	0.9	2.21E+07	1.10E+07	9.56E+06
T1	2	8	8	8	8	0	4	0	0	0	0	0	0	48	40	36	28	20	12	4	1.80E+07	0.9	1.62E+07	8.10E+06	8.10E+07
T2	1	8	8	8	8	8	7	1	0	0	0	0	0	48	47	40	32	24	16	8	1.80E+08	0.9	1.62E+08	8.10E+07	8.10E+07
T2	2	8	8	8	8	8	7	1	0	0	0	0	0	48	47	40	32	24	16	8	1.80E+08	0.9	1.62E+08	8.10E+07	8.10E+07
T3	1	8	8	8	8	8	4	1	0	0	0	0	0	48	44	37	29	21	13	5	6.95E+07	0.9	6.26E+07	3.13E+07	2.12E+07
T3	2	8	8	8	8	7	2	0	0	0	0	0	0	47	41	33	25	17	9	2	2.45E+07	0.9	2.21E+07	1.10E+07	1.10E+07
T4	1	8	8	8	8	8	2	0	0	0	0	0	0	48	48	42	34	26	18	10	3.36E+08	0.9	3.02E+08	1.51E+08	9.12E+07
T4	2	8	8	8	8	8	4	1	0	0	0	0	0	48	44	37	29	21	13	5	6.95E+07	0.9	6.26E+07	3.13E+07	3.13E+07
T5	1	8	8	8	8	8	2	0	0	0	0	0	0	48	42	34	26	18	10	2	3.36E+07	0.9	3.02E+07	1.51E+07	3.12E+07
T5	2	8	8	8	8	8	5	1	0	0	0	0	0	48	45	38	30	22	14	6	1.05E+08	0.9	9.45E+07	4.75E+07	4.75E+07
T6	1	8	8	8	8	8	8	4	1	0	0	0	0	48	48	44	37	29	21	13	6.95E+08	0.9	6.26E+08	3.13E+08	4.65E+08
T6	2	8	8	8	8	8	6	1	0	0	0	0	0	48	48	46	39	31	23	15	1.37E+09	0.9	1.23E+09	6.17E+08	6.17E+08
T7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00E+00	0.9	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
T7	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00E+00	0.9	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00

Anexo 2. Concentración de las cepas bacterianas de *Lysobacter enzymogenes* usadas en semillas de trigo (Harvested 2000).

Effect of *Lysobacter* root growth inhibitor compound on germination of Russ Hard Spring Wheat seeds (Harvested 2000)

Test 2

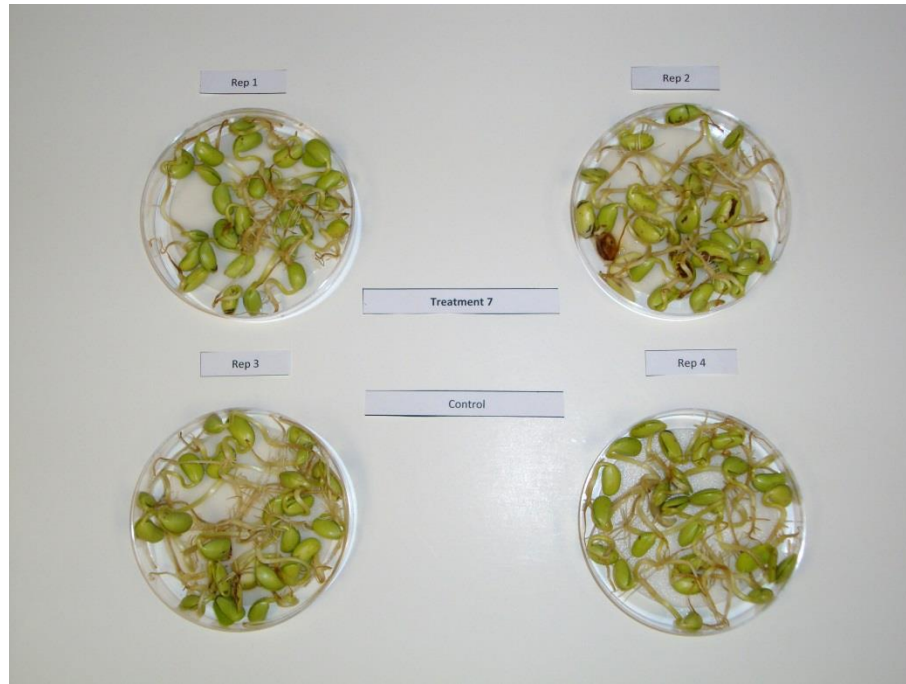
Investigator: Mercedes Telenchana

Date planted: April 4

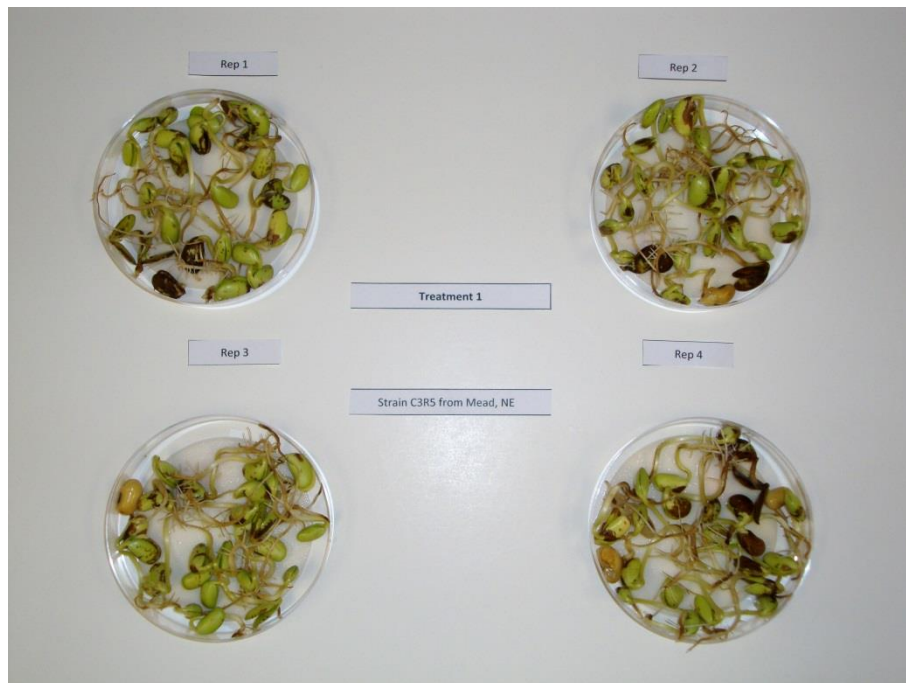
Date counted: April 7

Treatment	Rep	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Total 0-5	Total 1-6	Total 2-7	Total 3-8	Total 4-9	Total 5-10	Total 6-11	CFU/mL	Buffer volume (ml)	CFU/2seed	CFU/seed	Tri. means	Treatment
T1	1	8	8	8	8	8	8	1	0	0	0	0	0	48	41	33	25	17	9	1	2.45E+07	0.9	2.21E+07	4.41E+06	3.83E+06	C3R5
T1	2	8	8	8	8	7	1	0	0	0	0	0	0	47	40	32	24	16	8	1	1.80E+07	0.9	1.62E+07	3.24E+06		
T2	1	8	8	8	8	7	1	0	0	0	0	0	0	47	40	32	24	16	8	1	1.80E+07	0.9	1.62E+07	3.24E+06	2.57E+06	48B3
T2	2	8	8	8	8	6	0	0	0	0	0	0	0	46	38	30	22	14	6	0	1.05E+07	0.9	9.45E+06	1.89E+06		
T3	1	8	8	8	8	8	1	0	0	0	0	0	0	48	41	33	25	17	9	1	2.45E+07	0.9	2.21E+07	4.41E+06	2.43E+07	OH11
T3	2	8	8	8	8	8	7	2	0	0	0	0	0	48	47	41	33	25	17	9	2.45E+08	0.9	2.21E+08	4.41E+07		
T4	1	8	8	8	8	8	8	3	0	0	0	0	0	48	48	43	35	27	19	11	4.82E+08	0.9	4.34E+08	8.68E+07	5.28E+07	N4-7
T4	2	8	8	8	8	8	5	1	0	0	0	0	0	48	45	38	30	22	14	6	1.05E+08	0.9	9.45E+07	1.89E+07		
T5	1	8	8	8	8	7	3	0	0	0	0	0	0	47	42	34	26	18	10	3	3.36E+07	0.9	3.02E+07	6.05E+06	4.26E+06	U4
T5	2	8	8	8	8	6	1	0	0	0	0	0	0	46	39	31	23	15	7	1	1.37E+07	0.9	1.23E+07	2.47E+06		
T6	1	8	8	8	8	8	8	3	1	0	0	0	0	48	48	43	36	28	20	12	4.82E+08	0.9	4.34E+08	8.68E+07	1.06E+08	Control
T6	2	8	8	8	8	8	4	1	0	0	0	0	0	48	48	44	37	29	21	13	6.95E+08	0.9	6.26E+08	1.25E+08		
T7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00E+00	0.9	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	
T7	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00E+00	0.9	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	

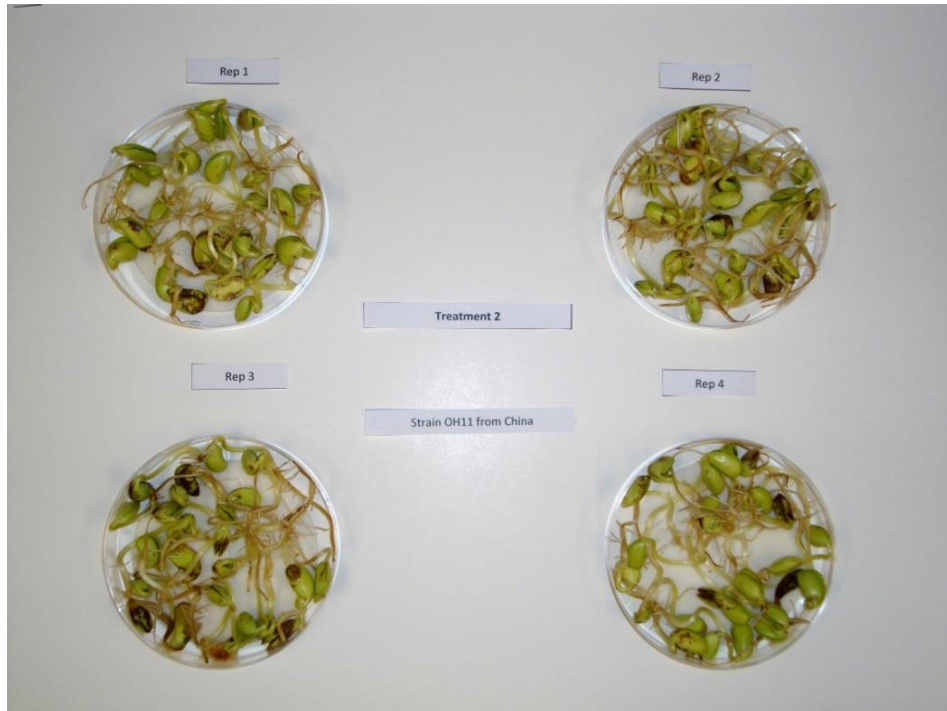
Anexo 3. Semillas de soya y trigo inoculadas con las cepas *Lysobacter enzymogenes*.



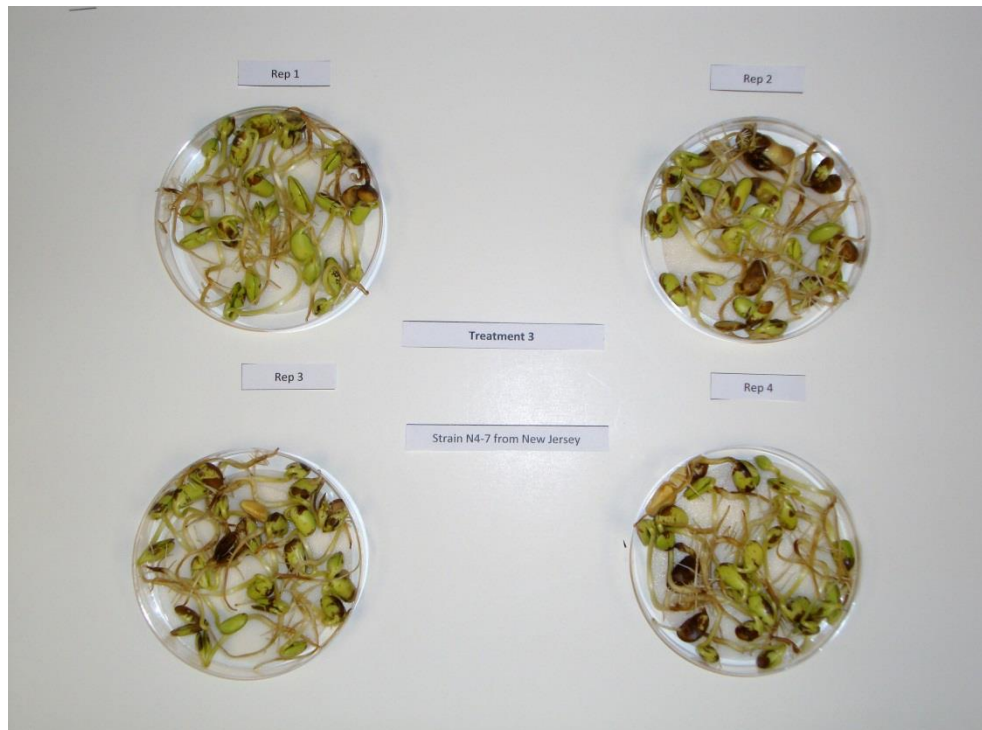
Semillas de soya sin inocular



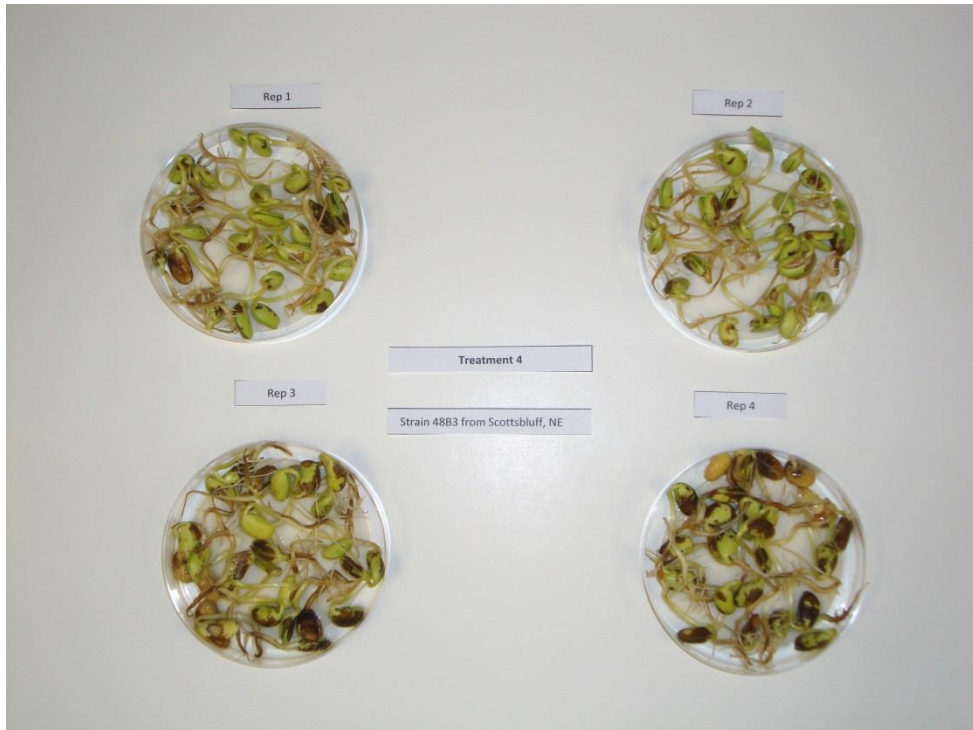
Semillas necróticas de soya inoculadas con *Lysobacter enzymogenes* C3R5 de Mead, Nebraska



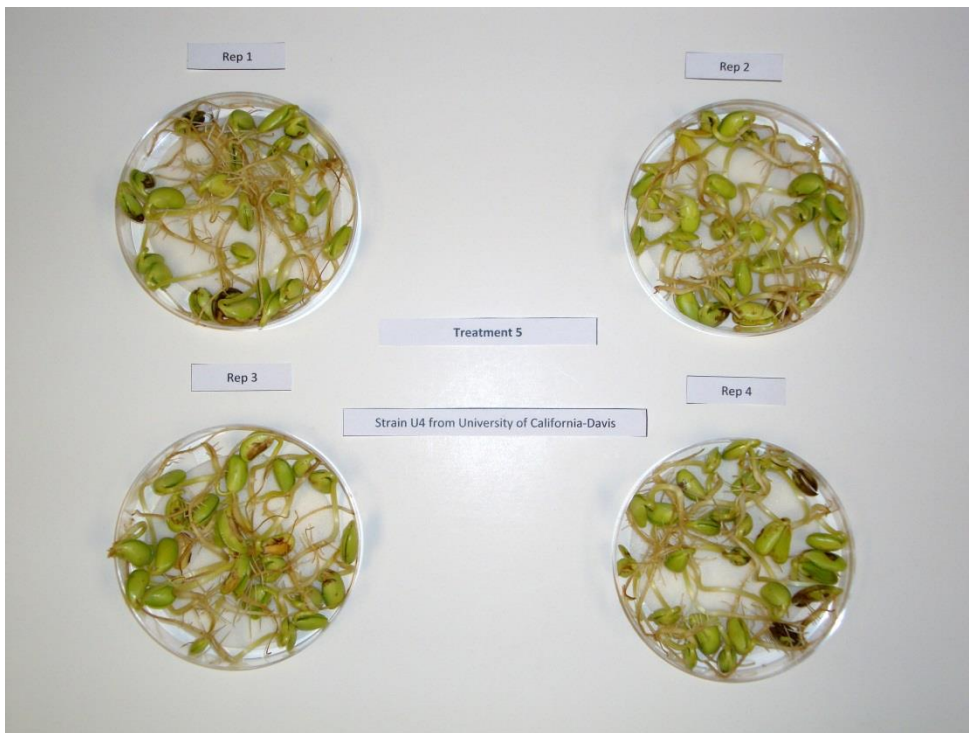
Semillas necróticas de soya inoculadas con *Lysobacter enzymogenes* OH11 de China



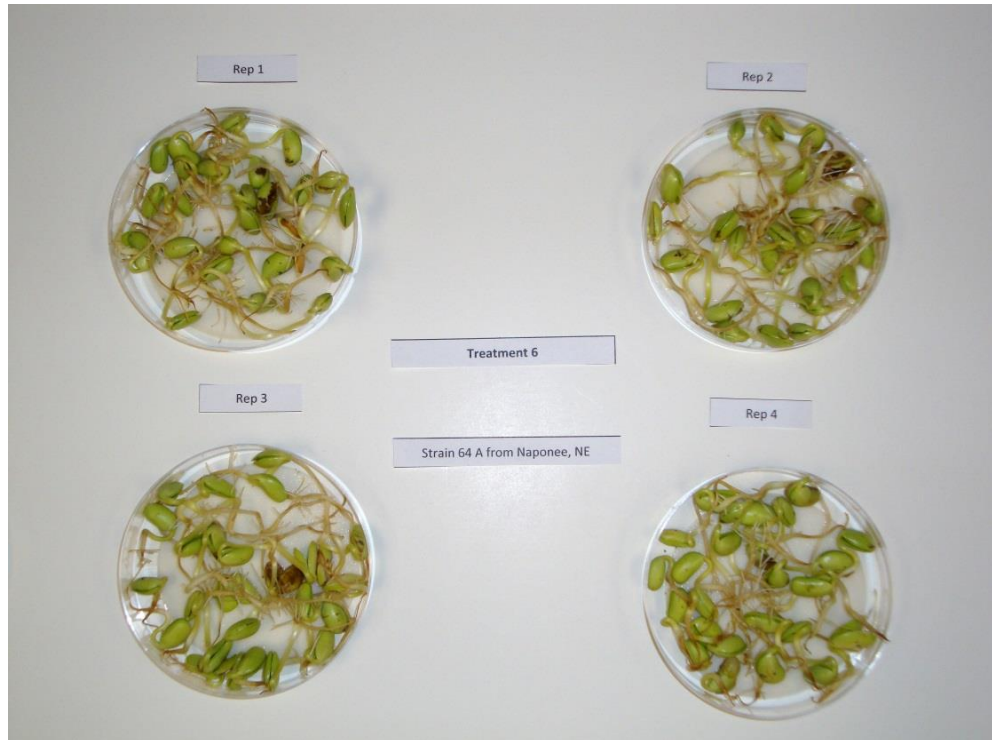
Semillas necróticas de soya inoculadas con *Lysobacter enzymogenes* N4-7 de New Jersey



Semillas necróticas de soja inoculadas con *Lysobacter enzymogenes* 48B3 de Scottsbluff, Nebraska



Semillas necróticas de soja inoculadas con *Lysobacter enzymogenes* U4 de la Universidad de California-Davis



Semillas necróticas de soja inoculadas con *Lysobacter enzymogenes* 64A de Naponee, Nebraska



Elongación de la raíz de las semillas de trigo sin inocular



Elongación de la raíz de las semillas de trigo inoculadas con *Lysobacter enzymogenes* C3R5 de Mead, Nebraska



Elongación de la raíz de las semillas de trigo inoculadas con *Lysobacter enzymogenes* OH11 de China



Elongación de la raíz de las semillas de trigo inoculadas con *Lysobacter enzymogenes* N4-7 de New Jersey



Elongación de la raíz de las semillas de trigo inoculadas con *Lysobacter enzymogenes* 48B3 de Scottsbluff, Nebraska



Elongación de la raíz de las semillas de trigo inoculadas con *Lysobacter enzymogenes* U4 de la Universidad de California-Davis



Elongación de la raíz de las semillas de trigo inoculadas con *Lysobacter enzymogenes* 64A de Naponee, Nebraska