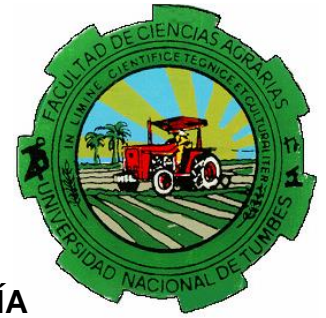




UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS



ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE SANIDAD VEGETAL Y PRODUCCIÓN

PECUARIA

TESIS

“Identificación y caracterización molecular de la microbiota de *Meloidogyne* spp. asociada al cultivo de espárrago (*Asparagus officinalis* L.) en la provincia de Virú – La Libertad”

PARA OPTAR EL TÍTULO DE: INGENIERO AGRÓNOMO

PRESENTADO POR:

- Br. Franco López Aponte

EJECUTOR

Ing. Pedro Gerardo Calle Ulfe M.Sc.

ASESOR

Mcblgo. Eddy Ortega Ramírez

CO-ASESOR

TUMBES – PERÚ - 2013



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS



ESCUELA ACADEMICA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA

**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE SANIDAD VEGETAL Y PRODUCCIÓN
PECUARIA**

TESIS

**“Identificación y caracterización molecular de la microbiota de
Meloidogyne spp. asociada al cultivo de espárrago (*Asparagus
officinalis* L.) en la provincia de Virú – La Libertad”**

PARA OPTAR EL TÍTULO DE: INGENIERO AGRÓNOMO

APROBADO POR:

Ing. Pedro Saúl Castillo Carrillo M.Sc.

PRESIDENTE DEL JURADO

Ing. Néstor Delfín Díaz Castillo Mg.

SECRETARIO

Mcbigo. Víctor Guzmán Tripul Mg.

VOCAL



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS



ESCUELA ACADEMICA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE SANIDAD VEGETAL Y PRODUCCIÓN

PECUARIA

TESIS

“Identificación y caracterización molecular de la microbiota de *Meloidogyne* spp. asociada al cultivo de espárrago (*Asparagus officinalis* L.) en la provincia de Virú – La Libertad”

PARA OPTAR EL TÍTULO DE: INGENIERO AGRÓNOMO

PRESENTADO POR:

Br. Franco López Aponte

EJECUTOR

Ing. Pedro Gerardo Calle Uife M.Sc.

ASESOR

Mcbigo. Eddy Ortega Ramírez

COASESOR

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Contenido	Pag.
DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTO	II
INDICE DE TABLAS	III
INDICE DE FIGURAS	IV
RESUMEN	VI
ABSTRACT	VIII
CAPITULO I INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO II ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	2
2. Descripción de los nematodos noduladores.	2
2.1. Generalidades.	2
2.2. Biología.	3
3. Métodos de control para <i>Meloidogyne</i> .	4
3.1. Métodos de control en general.	4
3.2. Bacterias utilizadas en el control biológico de nematodos.	4
4. Interacción de nematodos con las bacterias endosimbiontes.	5
5. Diagnóstico molecular de nematodos, bacterias y otros organismos.	8
CAPITULO III MATERIAL Y METODOS	11
1. Lugar de Ejecución del proyecto.	11
2. Duración del proyecto.	11
3. Reactivos, Materiales y Equipos.	11
3.1. Material biológico.	11
3.2. Material de laboratorio.	12
3.2.1. Aparatos y equipos.	12
3.2.2. Materiales de vidrio.	12
3.2.3. Reactivos.	12
3.2.4. Otros materiales.	13

3.3. Material de campo	13
4. Metodología.	13
4.1. Fase de campo	13
4.2. Fase de laboratorio	15
4.2.1. Extracción de nematodos.	15
4.2.1.1. Extracción y aislamiento directo desde raíz.	15
4.2.1.2. Extracción por el método de Baerman modificado.	15
4.2.2. Extracción de organismos endosimbiontes desde el nematodo.	17
4.2.3. Cultivo de bacterias (Siembra y purificación).	18
4.2.4. Obtención de cepario.	20
4.2.5. Identificación de nematodos y sus bacterias endosimbiontes a nivel molecular.	21
a) Extracción de ADN de nematodos directamente de la raíz.	21
b) Amplificación del gen 18s rRNA de nematodos.	22
c) Extracción de ADN de bacterias endosimbiontes.	23
d) Amplificación del gen 16s rRNA de bacterias endosimbiontes.	24
e) Secuenciación nucleotídica de ADN, tanto de nematodos como de las bacterias endosimbiontes.	25
f) Alineamiento de secuencias nucleotídicas de ADN, tanto de nematodos como de las bacterias endosimbiontes.	25
g) Análisis bioinformáticos de las secuencias nucleotídicas, de los nematodos y de las bacterias endosimbiontes.	26
h) Análisis filogenético de las secuencias de bacterias.	28
CAPITULO IV RESULTADOS	29
1. Aislamiento de nematodos noduladores asociados al espárrago.	29
2. Aislamiento de bacterias: cepario.	29
3. Amplificación del gen 18S rRNA de nematodos noduladores asociados al espárrago.	31

4. Análisis de secuencias nucleotídicas de nematodos noduladores.	31
5. Amplificación del gen 16S rRNA de bacterias.	32
6. Análisis de secuencias de ADN de cada cepa bacteriana.	33
7. Análisis bioinformático para árboles filogenéticos de bacterias	36
CAPITULO V DISCUSIÓN	40
CAPITULO VI CONCLUSIONES	43
CAPITULO VII RECOMENDACIONES	45
CAPITULO VIII BIBLIOGRAFÍA	46
ANEXOS	50
Anexo 1. Ubicación del área muestreada	50

DEDICATORIA

A Dios, a Jesús su hijo y a la virgen María, por guiarme e iluminarme por el camino correcto mediante las mejores decisiones, que me han conducido hacia el desarrollo de mis proyectos de vida y el logro de mis metas.

Este trabajo de investigación está dedicado a Elba mi madre quien se esmeró por darme una educación de calidad basada en valores y buenas costumbres, quien se esforzó por darme el apoyo necesario para culminar mi carrera profesional.

A mi familia, a mi abuelo Tulio que en paz descansa, a mi abuela María quien también ha aportado en mi educación, a mis tíos, tías, primos y primas que siempre me han apoyado.

A mis compañeros de trabajo y a mis amigos que directa e indirectamente contribuyeron en el desarrollo de este proyecto de tesis.

AGRADECIMIENTO

En primer lugar a Dios por las oportunidades que me ha puesto al frente durante el transcurso de mi vida.

Al Ph.D. Eric Mialhe por la oportunidad que me brindó en el Centro de Investigaciones para la realización de esta tesis, así como también a todos mis compañeros de trabajo que aportaron en el proceso de elaboración de esta investigación.

Al Blgo. Henry Robles Cueva y a los tecnólogos Diana Olivares Chorres, Cesar Santos Chanta y Norma Valencia Valverde por sus consejos y apoyo durante todo el desarrollo de la tesis en laboratorio.

Al Ing. MSc. Pedro Gerardo Calle Uffe, al Ing. M.Sc. Pedro Saúl Castillo Carrillo y al Ing. Mg. Néstor Delfín Díaz Castillo, por sus aportes, orientaciones y recomendaciones.

A los buenos docentes de la Universidad Nacional de Tumbes que a conciencia dan el todo en las aulas para formar a la siguiente generación de profesionales.

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Muestras de nematodos noduladores asociados al espárrago.....	29
Tabla 2. Resultado de la siembra del extracto de nematodos noduladores asociados al espárrago.....	30
Tabla 3. Morfología y características de las cepas bacterianas aisladas de nematodos noduladores asociados al espárrago.....	30
Tabla 4. Análisis en BLAST (Para nematodos noduladores asociados al espárrago).....	32
Tabla 5. Resultados del Análisis BLAST (Para cepa 2-M).....	33
Tabla 6. Resultados del Análisis BLAST (Para cepa 3-M).....	33
Tabla 7. Resultados del Análisis BLAST (Para cepa 21-M).....	34
Tabla 8. Resultados del Análisis BLAST (Para cepa 22-M).....	34
Tabla 9. Resultados del Análisis BLAST (Para cepa 25-M).....	34
Tabla 10. Resultados del Análisis BLAST (Para cepa 26-M).....	34
Tabla 11. Resultados del Análisis BLAST (Para cepa 27-M).....	35
Tabla 12. Resultados del Análisis BLAST (Para cepa 28-M).....	35

INDICE FIGURAS

	Pag.
Figura 1: Cultivo de espárrago con síntomas	14
Figura 2: Muestreo en espárrago	14
Figura 3: Raíz de espárrago con nódulos	16
Figura 4: Extracción directa desde sección de raíz	16
Figura 5: Materiales usados en la extracción de nematodos	16
Figura 6: Extracción por el método de Baerman	16
Figura 7: Juvenil 2 de <i>Meloidogyne</i> spp.	17
Figura 8: Tubos de 1,5 ml conteniendo nematodos	17
Figura 9: Esquema de la metodología de extracción de bacterias y su cultivo..	18
Figura 10: Siembra de extracto obtenido en la extracción de bacterias	19
Figura 11: Siembra de extracto obtenido en la extracción de bacterias	19
Figura 12: Revisión del crecimiento de colonias bacterianas después de 24 h .	19
Figura 13: Resultado de la tinción Gram	20
Figura 14: Siembra en caldo cultivo	21
Figura 15: Cepario	21
Figura 16: Raíces de espárrago con nódulos	22
Figura 17: Tubos conteniendo nódulos	22
Figura 18: Cepas en caldo de cultivo	23
Figura 19: Homogenización en vortex	23
Figura 20: Pantalla del termociclador con programa	24
Figura 21: Cámara electroforética con el gel en su interior	25
Figura 22: Transiluminador UV.....	25
Figura 23: Secuencias alineadas en usando MEGA 5.05	26
Figura 24: Software libre BLAST	27
Figura 25: Ejemplo en el que se observa los resultados del BLAST	28
Figura 26: Ejemplo en el que se observa los resultados del BLAST	28
Figura 27: Software Mega 5.05.	28

Figura 28: Amplicones de la región 18S de ADN ribosomal de nematodos	31
Figura 29: Amplicones de la región 16S de ADN ribosomal de bacterias	32
Figura 30: Árbol filogenético de cepas afines con el género <i>Bacillus</i>	37
Figura 31: Árbol filogenético de cepas afines con el género <i>Pseudomonas</i>	38
Figura 32: Árbol filogenético de cepas afines con el género <i>Acinetobacter</i>	39

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se desarrolló en los laboratorios del Centro de Investigaciones Biotec CMC – Tumbes desde noviembre del 2012 hasta febrero del 2013. Esta investigación se realizó con la finalidad de identificar y caracterizar las bacterias endosimbiontes de *Meloidogyne* spp. a nivel molecular.

Como primera etapa se realizó el aislamiento de nematodos noduladores de forma individual, tanto del suelo como de las raíces por extracción directa de forma manual o por el método de Baerman modificado, con la obtención de nematodos noduladores individuales se procedió con la siguiente etapa de extracción de bacterias endosimbiontes, y en paralelo se ejecutó la identificación molecular de los nematodos noduladores a nivel de género realizando la extracción de ADN directamente desde la raíz, que resultó ser sencilla y práctica, y un análisis bioinformático de la región 18S rRNA.

Para la extracción de bacterias endosimbiontes, se desinfectaron los nematodos del segundo estadio con alcohol al 50% dentro de un microtubo, seguido de seis lavados con buffer M9, 30 minutos en reposo de la muestra con cloruro de sodio al 2%, para luego romper los nematodos con ayuda de perlas de vidrio mediante la acción de un vortex. El producto obtenido en la extracción de bacterias fue sembrado en los medios de cultivo Agar nutritivo y PDA con antibiótico, se realizaron aislamientos de las colonias bacterianas obtenidas para ser purificadas, como resultado se obtuvieron ocho cepas bacterianas diferentes. Se extrajo ADN de cada cepa y se replicó el ADN por PCR, para luego realizar la secuenciación nucleotídica, seguida del análisis que determinó el género de las cepas: 2-M y 28-M del género *Bacillus*, las cepas 25-M, 26-M y 27-M del género *Acinetobacter*, y las cepas 3-M, 21-M y 22-M del género *Pseudomonas*. Posteriormente se realizó un análisis bioinformático de la región del gen 16S rRNA para la

caracterización de todas las cepas bacterianas mediante árboles filogenéticos elaborados en el software Mega 5.05, con un análisis comparativo de 10000 posibles árboles.

Palabras Clave: Caracterización, microbiota, *Meloidogyne*, análisis bioinformáticos.

ABSTRACT

The present research work was developed in the laboratories of Biotech CMC Research Center - Tumbes from November 2012 until February 2013. This research was conducted in order to identify and characterize the bacterial endosymbionts of *Meloidogyne* spp. at the molecular level.

As a first step was the isolation of root-knot nematodes individually, both the soil and the roots by direct extraction manually or by the method of Baerman modified, then proceeded to the next stage of bacterial endosymbionts extraction, and in parallel molecular identification of root-knot nematodes to genus, making the extraction of DNA directly from the root, which proved to be simple and practical, and bioinformatic analysis of the 18S rRNA region. For extraction of bacterial endosymbionts, disinfected second stage nematodes with 50% alcohol in a microtube, followed by six washes with M9 buffer, 30 minutes rest of the sample with sodium chloride at 2%, then break nematodes using glass beads through a vortex action.

The product obtained in the extraction of bacteria was seeded in the culture media, Nutrient agar and PDA with antibiotic, then isolations were done for purification of the bacterial colonies, finally obtained eight different bacterial strains. DNA was extracted from each strain was replicated DNA by PCR, then undertake nucleotide sequencing, followed by analysis to determine the gender of the strains: 2-M and 28-M of the genus *Bacillus*, strains 25-M, 26 -M and 27-M of the genus *Acinetobacter*, and strains 3-M, 21-M and 22-M of the genus *Pseudomonas*. After that, a bioinformatics analysis of the 16S rRNA gene region to characterize all bacterial strains using phylogenetic trees developed in the Mega software 5.05, with a comparative analysis of 10,000 possible trees.

Keywords: Characterization, microbiota, *Meloidogyne*, bioinformatic analysis.

I. INTRODUCCIÓN

En los campos del valle de Virú, el cultivo de espárrago (*Asparagus officinalis* L.) resulta ser uno de los más importantes tanto por el área de producción establecida, su rentabilidad; y asimismo por el impacto económico y social, ya que es fuente generadora de trabajo, servicios directos e indirectos, durante todo el proceso productivo.

En la actualidad se han presentado problemas fitosanitarios entre los cuales se reportan ataques del nematodo nodulador *Meloidogyne* spp. en Virú - La Libertad, pudiendo ser este un patógeno potencial y de fácil diseminación entre los fundos.

Al buscar métodos de control que no afecten al medio ambiente, se consideró a los agentes de control biológico alternativos, y la opción más conveniente fue la utilización de la microbiota de los nematodos, pero estos organismos endosimbiontes han sido escasamente estudiados en nematodos fitopatógenos. La mejor manera de identificar estos organismos es mediante el uso de las técnicas y herramientas de la biología molecular. La microbiota dentro de un organismo cumple funciones específicas para el beneficio del organismo hospedero, pero puede producirse un cambio en las condiciones y la microbiota se vuelve patógena oportunista, razón por la cual sería interesante conocer los organismos que constituyen la microbiota del nematodo nodulador y posteriormente emplearlos para su control. Como objetivo general este trabajo de investigación contempló identificar y caracterizar la microbiota del nematodo nodulador asociado a *Asparagus officinalis* usando marcadores moleculares; y los objetivos específicos fueron la identificación a nivel molecular de nematodos por genómica, y la elaboración de árboles filogenéticos de los organismos endosimbiontes obtenidos.

II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

1. Descripción de los nematodos noduladores.

1.1. Generalidades.

Más de 40 géneros de nematodos actúan como parásitos obligados de plantas superiores (Perry y Moens, 2006). Los nematodos parásitos de plantas infectan una gran variedad de órganos de la planta, incluyendo semillas, pero la mayoría de las especies están restringidas a las raíces. Muchos de estos son ectoparásitos o endoparásitos migratorios. La mayoría de ellos pertenecen al orden Rhabditida (Perry y Moens, 2011). Dentro de este orden, los nematodos del género *Meloidogyne* son responsables de grandes pérdidas en cultivos de importancia económica. Entre las especies más importantes económicamente se encuentran *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria*. *M. incognita* habita en climas tropicales y es posiblemente el parásito más dañino de los cultivos en el mundo.

Este nematodo posee una amplia gama de hospedantes y provoca daños en cultivos, tales como espárrago, tomate, papa, algodón, pimiento, etc. (Arias *et al.*, 2009). Los ciclos de vida de la mayoría de nematodos fitoparásitos son en general muy similares. Todos los nematodos tienen cuatro etapas juveniles. Después de la última muda los nematodos se diferencian en machos y hembras. Un ciclo de vida de huevo a huevo puede ser completado dentro de 2 a 4 semanas en condiciones óptimas ambientales (Agrios, 2005).

1.2. Biología de los nematodos.

Las hembras ponen los huevos en una matriz gelatinosa, y la primera etapa (J1) tiene una primera muda, mientras que todavía se encuentran en el huevo con forma de gusano, o vermiforme (diámetro de 15 μm , longitud 400 μm), en la segunda etapa los jóvenes salen de los huevos utilizando sus estiletes para romper la cubierta dura del huevo. Los juveniles del segundo estado (J2) son el estado infeccioso de los nematodos noduladores. Después de penetrar en los ápices de las raíces de los huéspedes adecuados, los juveniles migran al cilindro vascular en desarrollo y comienzan a alimentarse de varias células cercanas de la endodermis (Trigiano *et al.*, 2004).

Estos endoparásitos sedentarios son capaces de manipular la biología de células vegetales mediante la inyección de moléculas efectoras (Gheysen y Mitchum, 2011). Los efectores del nematodo consisten en proteínas y otras moléculas secretadas por los parásitos para facilitar la penetración y migración en la raíz de la planta, para evitar o contrarrestar la respuesta de defensa vegetal, y para iniciar o mantener el desarrollo de los sitios de alimentación (Gheysen y Mitchum., 2011). Los nematodos agalladores estimulan media docena de células del parénquima vascular que experimentaran mitosis repetidas sin citocinesis intermitente. El resultado es células gigantes que contienen múltiples núcleos grandes (hasta >100) y se almacenan en el tejido proliferado que forma una vesícula o nódulo de la raíz (Gheysen y Mitchum, 2009).

Una vez que los juveniles comienzan a alimentarse, se someten a una serie de tres mudas adicionales. Los juveniles de tercer y cuarto estado son de etapas de corta duración y están ligeramente hinchados con forma de salchicha en su apariencia. Los nematodos parásitos presentan dimorfismo sexual. Las hembras se

agrandan y vuelven esféricas (diámetro de 400 μm , longitud 700 μm), mientras que los machos mudan y toman una forma vermiforme relativamente grande (diámetro de 30 μm , longitud de 1400 μm) y migran de la raíz al exterior. El ciclo de vida por lo general requiere de 21 a 50 días, dependiendo de la especie, la planta huésped y el medio ambiente (Trigiano *et al.*, 2004).

2. Métodos de control para *Meloidogyne*.

2.1. Métodos de control en general.

Varios métodos de control efectivo de nematodos se encuentran disponibles. El control es por lo general realizado a través de prácticas culturales, tales como el uso de material de plantación limpio, la rotación de cultivos, barbechos y cultivos de cobertura, mediante el control biológico de variedades resistentes y algunos otros medios, tales como enmiendas orgánicas y antagonistas naturales o genéticamente ingenieros o bacterias parásitas y hongos, a través del control por medio de agentes físicos, tales como la labranza, el calor, como la solarización, y las inundaciones, y mediante el control con productos químicos, tales como diversos tipos de fumigantes y nematicidas no fumigantes (Agrios, 2005).

2.2. Bacterias utilizadas en el control biológico de nematodos.

La búsqueda de nuevas alternativas ambientalmente amigables con las cuales controlar las poblaciones de nematodos parásitos de las plantas se ha convertido cada vez más importante (Tian, Yang y Zhang, 2007). Los nematodos en el suelo están expuestos a infecciones por bacterias y hongos. Esto crea la posibilidad de utilizar

los microorganismos del suelo para controlar los nematodos parásitos (Jatala, 1986).

Como un grupo de enemigos naturales importantes de nematodos plaga, las bacterias nematófagas muestran diferentes modos de acción: estos incluyen parasitismo, producción de toxinas, antibióticos, enzimas, competencia por nutrientes, inducción sistémica de resistencia de plantas y promotores de la planta saludable. Ellas actúan sinérgicamente a través de la supresión directa de nematodos, promoviendo el crecimiento de la planta y facilitando la colonización de la rizósfera y la actividad antagonista microbial. Las bacterias nematófagas conocidas hasta ahora incluyen bacterias parásitas, un ejemplo de estas es *Pasteuria penetrans*, bacterias parásitas oportunistas como lo son *Brevibacillus laterosporus* y *Bacillus sp.* B16, rizobacterias, bacterias formadoras de la proteína Cry, bacterias endofíticas y bacterias simbióticas (Tian, Yang y Zhang, 2007).

3. Interacción de nematodos con las bacterias endosimbiontes.

Los nematodos se encuentran protegidos del exterior por una cutícula muy dura e impermeable, que proporciona una excelente barrera contra las agresiones externas.

Son pocos los parásitos especializados capaces de perforar a través de esta armadura blindada y proliferar dentro del nematodo, tales como el hongo *Drechmeria coniospora* y la bacteria *Pasteuria penetrans*, pero la mayoría de las enfermedades de los nematodos implican ataque desde el interior, a través de la colonización del tubo digestivo, que es necesariamente un tejido más vulnerable. Muchos nematodos de vida libre viven alimentándose de bacterias, por lo que en un entorno

natural están constantemente expuestos a un amplio espectro de microbios potencialmente patógenos (Hodgking y Partridge, 2008).

Bacterias endosimbiontes no cultivables en hembras de los nematodos parásitos de plantas *Globodera rostochiensis* y *Heterodera goettingiana* y en juveniles de *Heterodera glycines* se observaron por primera vez con ayuda de la microscopía electrónica de transmisión (TEM). Estos organismos se caracterizan por tener forma de bastón, que van desde 0,3 μm a 0,5 μm de diámetro y 1,8 μm a 3 μm de longitud y que contienen estructuras descritas como cuerpos de inclusión estriados o estructuras tubulares (Noel y Atibalentja, 2006).

Una población de *H. glycines* fue obtenida de un campo de soya, donde nematodos infectados fueron recolectados y examinados con el fin de realizar estudios de TEM de hembras y machos. Las bacterias se observaron en el pseudoceloma y el intestino de los juveniles, hembras y machos, en los acordes hipodérmicos de los adultos y jóvenes, en las paredes de los ovarios y en los ovocitos y los espermatozoides. Un análisis filogenético de los genes 16S ARNr y *gyrB* de la bacteria infectiva de *H. glycines* reveló 93% y 81% de identidad de secuenciación, respectivamente, para genes homólogos en '*Candidatus Cardinium hertigii*'. Así el nombre '*Candidatus Paenicardinium endonii*' es propuesto para la bacteria endosimbionte del nematodo fitopatógeno *H. glycines* (Noel y Atibalentja, 2006).

Especies de nematodos del grupo *Xiphinema americanum* (Nematoda, Longidoridae), *Xiphinema americanum*, *Xiphinema rivesi* y *Xiphinema brevicollum*, albergan sus propios endosimbiontes verrucomicrobial específicos, son exclusivamente heredados de la madre y sus hospederos se reproducen por teliotokia (de madre a hija) ó partenogénesis, los machos son muy escasos. Estos

endosimbiontes forman un nuevo género, *Candidatus Xiphinematobacter*., con tres nuevas especies *Candidatus verrucomicrobial*, *Candidatus Xiphinematobacter americani* sp. *Candidatus Xiphinematobacter rivesi* sp *Candidatus Xiphinematobacter brevicolli*, estas se describen en base a la microscopía electrónica de transmisión, microscopía electrónica de barrido, microscopía de epifluorescencia y el análisis de la secuencia 16S rDNA (Vandekerckhove *et al.*, 2000).

En el nematodo fitoparásito *Belonolaimus longicaudatus* se reporta a *Candidatus Pasteuria usgae* una bacteria Gram-positiva, endoparásita obligada del pseudoceloma de *Belonolaimus longicaudatus* (Giblin *et al.*, 2003).

Otro ejemplo son las bacterias endosimbiontes de los nematodos entomopatógenos. Nematodos miembros del género *Steinernema* y *Heterorhabditis* tienen una relación mutualista con bacterias endosimbiontes del género *Xenorhabdus* (Noel y Atibalentja, 2006).

Un ejemplo más es el nematodo de vida libre *Caenorhabditis elegans* que se ha convertido en un hospedero cada vez más popular para el estudio de la patogénesis, se trata de un organismo modelo establecido, con numerosas ventajas técnicas (Hodgking y Partridge, 2008). Un nuevo patógeno fue descubierto de una muestra del nematodo *Caenorhabditis elegans* aislado de un pozo de compost en Francoville, en las afueras de Paris. Las células intestinales de este nematodo fueron observadas por estar llenas de pequeñas barras microbiales, sugiriendo la presencia de un patógeno intracelular. Las secuencias de ADN recombinante se separaron lo suficiente de su más cercano homólogo para justificar la construcción de un género

nuevo microsporidian, Nematocida, y el patógeno fue nombrado *Nematocida parisii* (Hodgking y Partridge, 2008).

4. Diagnóstico molecular de nematodos, bacterias y otros organismos.

Los métodos tradicionales de identificación (morfológicos) son lentos, muy subjetivos y laboriosos, por lo cual a veces pueden ser inefectivos. Por otro lado, las herramientas de biología molecular se han estado utilizando con mayor frecuencia para la separación de especies y patotipos de nematodos, y se espera que lleguen a ser de uso rutinario. Algunas de estas herramientas incluyen la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) con iniciadores específicos y la de PCR-RFLP, proteómica, entre otros (Vejl *et al.*, 2002).

Por medio del diagnóstico tradicional se han logrado identificar aproximadamente 25 000 especies de nematodos y se estima que faltan por describir entre 10 y 40 veces más especies. Así, se piensa que los métodos moleculares pueden ayudar a agilizar este proceso (Powers, 2004). En este proyecto de investigación se han usado iniciadores pertenecientes al 18S rRNA para la identificación del nematodo nodulador. 18S rRNA ribosómico (rRNA 18S abreviada) es una parte del ARN ribosómico. La "S" en 18S representa Svedberg unidades. 18S rRNA es un componente de la pequeña subunidad ribosomal eucariota (40S). 18S rRNA es el ARN estructural para el pequeño componente del ribosoma eucariota, y por lo tanto uno de los componentes básicos de todas las células eucariotas (Meyer *et al.*, 2010), y para el caso de bacterias se han usado iniciadores pertenecientes a la región 16S rRNA. 16 S RNA ribosomal (o 16 S rRNA) es un componente de la pequeña subunidad 30S del ribosoma procariota de 1,542 Kb (o 1542 nucleótidos) de longitud. Los genes

que codifican para 16S rDNA se utilizan en la reconstrucción de filogenias. Ya que está altamente conservada entre especies diferentes de bacterias y arqueas (Coenve y Vandamme, 2003).

El diagnóstico molecular se utiliza más específicamente para la caracterización de un organismo basado en la información de su ADN o la estructura del ARN. Para el diagnóstico, los genes homólogos o fragmentos de ADN o ARN, cuya secuencia difiere entre las especies, pero es similar para todos los individuos de la misma población o especie, se seleccionan y comparan. Técnicas basadas en el estudio de ADN o ARN son los métodos más utilizados para los estudios de identificación, taxonomía y filogenética (Punja, 2007).

Recientes progresos en el desarrollo de diagnóstico molecular basado en PCR han ofrecido un reemplazo potencial de los métodos tradicionales. La PCR ha ampliado enormemente el poder de la investigación del ADN recombinante y ha encontrado aplicaciones en un amplio rango de disciplinas, incluyendo la biología molecular, la genética y la evolución. Una de las grandes ventajas de esta técnica radica en que, a diferencia de otras técnicas de ADN recombinante, en las que se requiere la disponibilidad de grandes cantidades de un segmento específico de ADN, la PCR permite la amplificación directa de segmentos de ADN específicos sin clonación, y pueden utilizarse fragmentos de ADN que están presentes en cantidades ínfimamente pequeñas (Klug y Cummings, 1999).

Con la intención de estudiar bacterias en nematodos Troemel *et al.*, 2008, reportan el siguiente experimento para extracción de bacterias endosimbiontes, específicamente de la clase Microsporidia, del nematodo de vida libre *Caenorhabditis elegans*:

Los nematodos infectados se lavan con M9 buffer (Para 1 litro: 3g de KH_2PO_4 , 6g de Na_2HPO_4 , 5g de NaCl , 1ml de MgSO_4 (1Molar) y 1l de dH_2O) por varias veces, y luego son destrozados con perlas de silicio

con ayuda del vortex. El extracto se siembra en varios tipos de medios, incluyendo TSA (por sus siglas en inglés Tryptic Soy Agar), agar nutritivo y agar infusión cerebro corazón.

Por otra parte se ha venido desarrollando un método rápido y simple de identificar los nematodos parásitos de plantas, con base en el análisis de los perfiles de proteínas de nematodos generados por MALDI-TOF MS que es una técnica de ionización suave utilizada en espectrometría de masas, Se denomina MALDI por sus siglas en inglés *Matrix - Assisted Laser Desorption / Ionization* (desorción / ionización láser asistida por matriz) y TOF por el detector de iones que se acopla al MALDI y cuyo nombre procede también de sus siglas en inglés *Time-Of-Flight* (Tiempo de Vuelo) (Perera *et al.*, 2005).

Para el caso de métodos clásicos utilizados para la identificación de especies bacterias que se han basado en la morfología y perfiles bioquímicos. El uso de estos métodos estándar es un proceso largo sobre la base de interpretación de los datos subjetivos.

Debido a esto Pignome *et al.*, 2006, nos presenta un estudio de las especies del grupo *Mycobacterium* que se caracterizan por la utilización de (MALDI-TOF MS). Esta tecnología está diseñada para proporcionar una huella digital en masa espectral característica basado en adsorción de iones de la superficie celular.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Lugar de ejecución del proyecto:

Fase de campo:

Departamento	: La libertad
Provincia	: Virú
Distrito	: Chao

Fase de laboratorio:

Departamento	: Tumbes
Provincia	: Tumbes
Distrito	: Tumbes
Institución	: Centro de Investigaciones Biotec CMC

2. Duración del proyecto:

El presente trabajo de investigación tuvo una duración de cuatro meses desde la colecta de muestras en campo, la identificación, caracterización molecular y presentación del informe final.

3. Reactivos, materiales y equipos:

3.1. Material biológico.

- Suelo colectado en los fundos que reportan la presencia de *Meloidogyne* spp.
- Raíces de espárrago infectadas con nematodos noduladores.

3.2. Material de Laboratorio.

3.2.1. Aparatos y equipos.

Cámara de flujo laminar, Incubadora, refrigeradora de -4 °C, congelador de -20 °C, estereoscopio Olympus, microscopio óptico Olympus modelo CX31, microscopio confocal Olympus, centrifuga de sobremesa con temperatura regulable, termociclador, minicentrifuga modelo C1301 para tubos 0,2ml, microondas, equipo de electroforesis (cubeta, soporte, peine, fuente de alimentación), transiluminador de luz UV, autoclave vertical modelo HWK, centrifuga modelo Smartpec Plus, balanza analítica modelo SA210, pH metro portátil modelo Orion 3star, balanza de precisión modelo PS 0.1/1000 g, micropipetas automáticas fijas de 10 µl, 50 µl, 20 µl, 200 µl y 1000 µl, agitador magnético, varilla de agitador magnético 30x8 mm.

3.2.2. Materiales de vidrio.

Láminas porta-objetos, láminas porta-objetos cóncava, beakers de 1000 ml, 250 ml y de 50 ml, probetas graduadas de 1000 ml, 500 ml, 50 ml, 10 ml, embudos de 100 mm, matraz Erlenmeyer 500 ml, placas Petri, asas de siembra.

3.2.3. Reactivos

Fosfato monopotásico (KH_2PO_4), fosfato sódico dibásico (Na_2HPO_4), cloruro de sodio (NaCl), sulfato de magnesio (MgSO_4), TSA (Tryptic soy agar), agar nutritivo, glicerol, proteinasa K, Tris, EDTA, SDS 1%, fenol/cloroformo/alcohol isoamilico (25:24:1), cloroformo/alcohol isoamilico (24:1),

isopropanol, acetato de sodio, etanol 70%, ARNasa, MgCl₂, agua destilada, bromuro de etidio, agarosa.

3.2.4. Otros materiales.

Puntas desechables de 10 µl, 50 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl, micro tubos de 1,5 ml, micro tubos de 0,2 ml, tubos falcon de 50 ml, tubos falcon de 15 ml, algodón, bisturís, guantes de latex qualatex, gorros quirúrgicos para atar MÖLHER, papel aluminio Platinum, mascarillas cónicas con liga, pinzas, tijeras, parafilm, computadora, impresora, software para análisis de datos (MEGA 5,05), lápiz marcador, lapiceros, lápices.

3.3. Material de campo.

Libreta de apuntes, lapicero, cámara digital, paquete de bolsas de polietileno, marcador indeleble.

4. METODOLOGÍA

4.1. Fase de Campo.

Las evaluaciones se realizaron en los cultivos de espárrago (*Asparagus officinalis*); ubicados en el distrito de Chao, provincia de Virú – La Libertad.

Los diferentes puntos de muestreo en campo que se utilizaron para la evaluación, fueron aquellos que presentaron los síntomas característicos del ataque de nematodos (marchitez, clorosis y enanismo) (Fig. 1 y Fig. 2). Además el área de muestreo ya tenía una referencia por un historial con alto índice de incidencia de ataque causado por nematodos noduladores, estos datos fueron otorgados por encargados del fundo.

Las muestras se tomaron al azar y al pie de las plantas con síntomas de ataque por *Meloidogyne*, a una profundidad de 20 cm. Cada muestra estuvo compuesta por raíces noduladas y suelo (1 kg aprox./muestra), que se transportó al laboratorio para el procesamiento respectivo.



Figura 1. Cultivo de espárrago con síntomas



Figura 2. Muestreo en espárrago

4.2. Fase de laboratorio.

4.2.1. Extracción de nematodos.

Para esta parte se extrajeron nematodos de diferentes estadios directamente de las muestras de raíces de espárrago con ayuda de una hoja de bisturí, palitos mondadientes y un microscopio compuesto (Fig. 5). Así como también se usó el método de Baerman modificado.

4.2.1.1. Extracción y aislamiento directo desde la raíz.

Para la extracción directa se escogieron 20 muestras de raíces noduladas (Fig. 3). Se cortó secciones delgadas del nódulo y se colocaron en una lámina porta objeto (Fig. 4), sobre la cual se agregaron algunas gotas de agua para facilitar la visualización y manipulación en el microscopio. Con el palito mondadientes se separaron los juveniles II que en muchas ocasiones se observaron cuando empezaban a eclosionar desde las masas de huevos, finalmente se aislaron todos los juveniles en un tubo de 1,5 ml por cada muestra con ayuda de una micropipeta. Cada muestra constó de 5 gramos de raíces noduladas.

4.2.1.2. Extracción por el método de Baerman modificado.

Se pesaron 100 gramos de muestra de suelo, previamente homogenizada. En paralelo se colocó un embudo sobre un soporte universal, se selló el embudo en su extremo inferior con parafilm, y a continuación se puso una hoja de papel toalla dentro del embudo dándole la forma del embudo. Luego se agregó agua destilada hasta llenar toda la zona angosta del embudo y los 100 gramos de muestra

de suelo se colocaron sobre el papel toalla dentro del embudo, de inmediato se adicionó agua destilada cuidadosamente por los bordes de la boca del embudo con ayuda de una pizeta hasta saturar la muestra completamente para luego dejar reposar durante 48 horas (Fig. 6). Pasado el tiempo se extrajo el filtrado en un beaker y se conservó en tubos Falcon de 50 ml hasta su uso. Este proceso de extracción se repitió en tres ocasiones con cada uno de los muestreos (20 muestras de diferentes puntos al azar en la parcela).

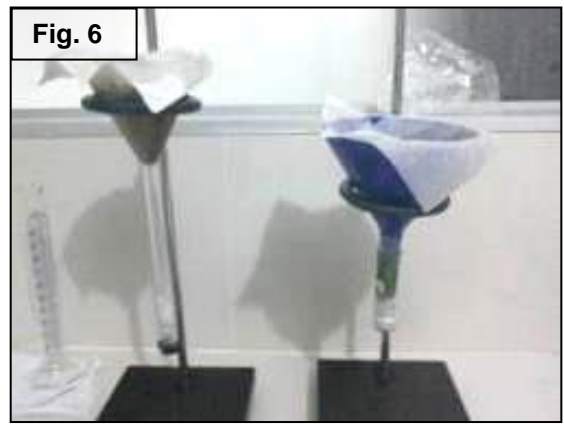
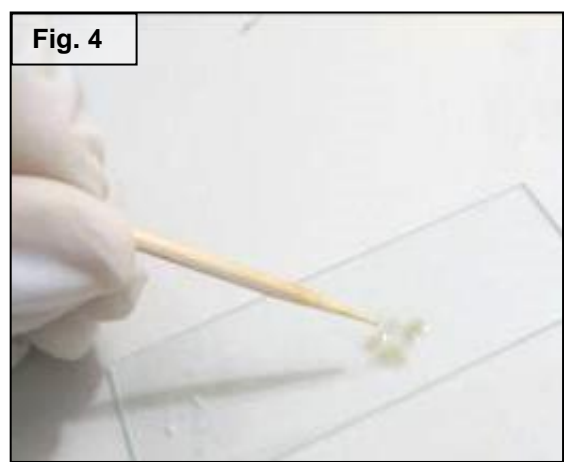
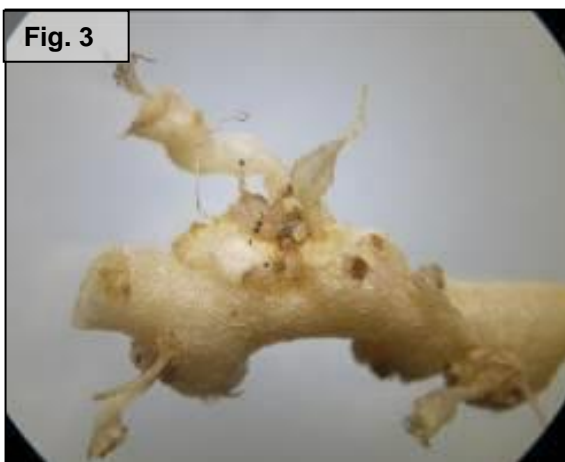


Figura 3. Raíz de espárrago con nódulos. Figura 4. Extracción directa desde sección de raíz. Figura 5. Materiales usados en la extracción de nematodos. Figura 6. Extracción por el método de Baerman.

Una vez obtenido el filtrado, se procedió al aislamiento de juveniles como se describe a continuación: En una lámina portaobjetos cóncava se colocó una gota de 30 μ l de muestra del producto filtrado en el procedimiento anterior (Metodo Baerman modificado).

Con ayuda de un microscopio compuesto y una micropipeta (10 μ l–0,5 μ l) se tomó 1 gota (1 μ l aprox.) de agua destilada para colocarlo sobre el nematodo visualizado en el microscopio con la intención de limpiar un poco el área que lo rodea (Fig. 7), ya que el agua tenía muchas impurezas, a continuación se capturó los nematodos de forma individual con ayuda de la misma micropipeta, y estos fueron depositados en tubos eppendorf de 1,5 ml como se observa en la Figura 8, para luego ser usados en la extracción de bacterias.



Figura 7. Juvenil 2 de *Meloidogyne* spp.



Figura 8. Tubos de 1.5 ml conteniendo nematodos.

4.2.2. Extracción de organismos endosimbiontes desde el nematodo.

En 20 tubos eppendorf se colocó 20 nematodos por tubo y se agregó 120 μ l de alcohol al 50%, y se llevó a la centrifuga a 4000 rpm / 5 minutos, luego se retiró la parte líquida, dejando solo los nematodos. A continuación se lavó con M9 buffer 6 veces. Seguido del último lavado se colocó NaCl al 2% y se dejó en reposo por 30 minutos. Una vez pasado el tiempo, se centrifugó los tubos

ependorf a 4000 rpm / 5 minutos. Se extrajo parte de la solución, dejando 1/5 (parte inferior).

Se volvió a colocar M9 en proporción 4:5 del volumen ocupado por los nematodos y se agregó 2 perlas de vidrio en cada eppendorf, luego fueron llevados al vortex por 1 minuto para romper a los nematodos y por último se dio un pulso de centrifugación (Fig. 9).

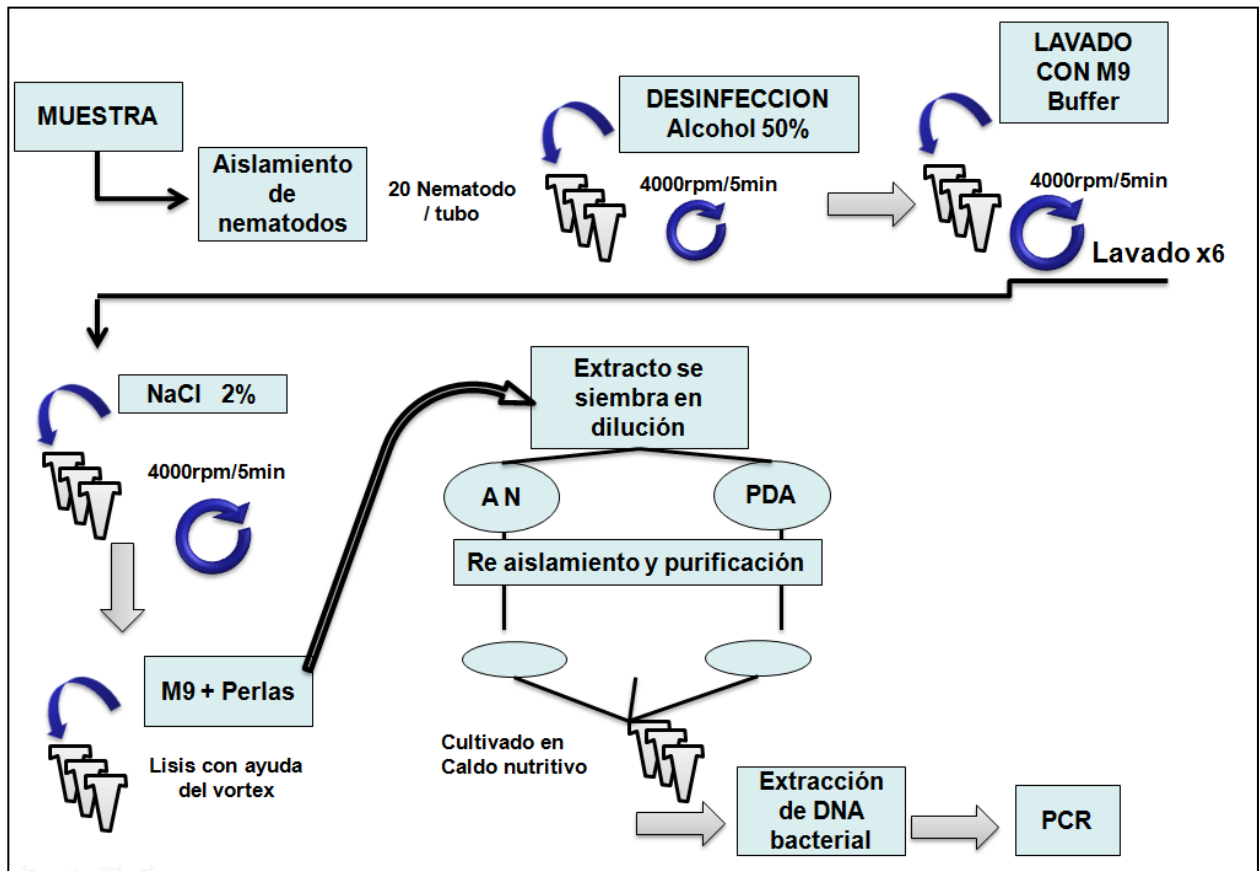


Figura 9. Esquema de la metodología de extracción de bacterias y su cultivo. [Esquema elaborado por el autor de tesis].

4.2.3. Cultivo de bacterias (siembra y purificación).

Del extracto obtenido en el procedimiento anterior se sembró en 2 tipos de medios (Agar Nutritivo y PDA). Cada una de las 20 muestras se sembró por triplicado en cada uno de los medios, en absoluta asepsia (Fig. 10 y 11), como se describe a continuación.

Se hicieron diluciones del extracto de 10^{-3} con NaCl al 0,85 %, con ayuda de un asa de Digrafsky, se diseminó 50 μ l de extracto (10^{-3}) en el medio de cultivo en placa en condiciones de rigurosa asepsia. Luego fueron incubadas a 30 °C por 24 horas (Fig. 12). El proceso de aislamiento para purificación se realizó de la siguiente manera: El medio con colonias bacterianas desarrolladas fue observado para escoger las colonias y proceder con la siembra de purificación, que se efectuó por estriado sobre la superficie de un medio sólido nuevo en una placa Petri. Las placas se protegieron y se incubaron a 30 °C por 24 horas. Para cada cepa pura se le realizó una tinción diferencial de Gram con la finalidad de determinar la morfología y el tipo de pared bacteriana que presentó cada cepa, bacteria Gram (+) o Gram (-) (Fig. 13).

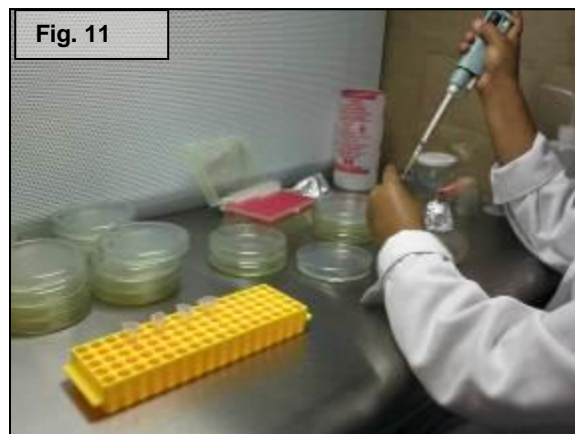


Figura 10 y 11. Siembra de extracto obtenido en la extracción de bacterias.
Figura 12. Revisión del crecimiento de colonias bacterianas después de 24 h de incubación.

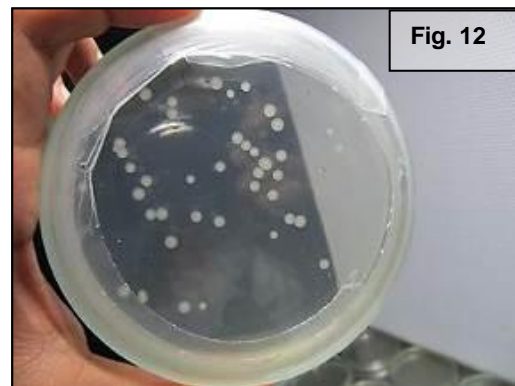




Figura 13. Resultado de la tinción Gram.

4.2.4. Obtención de cepario.

Se colocó 1 ml de caldo de cultivo TSB (Tryptic Soy Broth por sus siglas en inglés, es un medio líquido de soya y caseína) por cada tubo eppendorf usado, dependiendo del número de cepas obtenidas. De las colonias aisladas en placas se tomó una pequeña muestra con un asa de Colle (Fig. 14), la muestra tomada se sembró en caldo y se llevó a incubar por 24 horas a 30 °C. Del caldo previamente incubado, se tomó 20 µl para hacer diluciones a 10^{-3} y de esta dilución se extrajo 20 µl para ponerlos sobre un medio TSA o AN en placa, y se llevó a incubar por 24 horas a 30 °C.

Pasado el tiempo de incubación, en las placas con crecimiento bacteriano se agregó 3000 µl de caldo TSB por placa (de 1000 en 1000), con el fin de esparcir el caldo en toda la placa.

Se usaron tubos eppendorf para guardar alícuotas de este lavado (425 µl / tubo). Los tubos fueron llevados a 4°C por 20 minutos, luego se agregó 75 µl de glicerol estéril.

Por último las muestras se conservaron a -20 °C por tiempo indeterminado, hasta su uso (Fig. 15).



Figura 14. Siembra en caldo de cultivo.



Figura 15. Cepario.

4.2.5. Identificación de nematodos y sus bacterias endosimbiontes a nivel molecular.

a) Extracción de ADN de nematodos directamente de la raíz.

Se procesaron 20 muestras de raíces noduladas (Fig. 16) y el procedimiento fue el siguiente: en tubos de 1,5 ml se colocó 15 nódulos de raíz de cada muestra. Luego se molieron y se les agregó 750 μ l CTAB 2X y 2 μ l de β -mercaptoetanol por muestra. Se incubó a 65 °C por 45 minutos, pasado este tiempo se dejó enfriar por 5 minutos a temperatura ambiente (Fig. 17).

Luego se agregó 750 μ l de cloroformo alcohol isoamílico (24:1) y se agitó los tubos en un vortex hasta homogenizar. Se centrifugó a 14 000 rpm por 5 minutos, se transfirió el sobrenadante a nuevos tubos eppendorf. Se incubó previamente buffer CTAB 10X a 65 °C hasta homogenizar. Se agregó 75 μ l CTAB 10X, y se agitó hasta homogenizar. A continuación se agregó 650 μ l de cloroformo alcohol isoamílico (24:1), seguido se agitó con vortex hasta

homogenizar. Se centrifugó a 14 000 rpm por 10 minutos. Se transfirió el sobrenadante a tubos estériles. Se agregó 500 µl de isopropanol (previo enfriamiento a -20 °C) y se agitó por 10 segundos, luego se centrifugó a 14 000 rpm por 20 minutos. Se descartó el sobrenadante y se agregó 1 ml de etanol 70%, luego se centrifugó a 14 000 rpm por 15 minutos dos veces y se decantó el etanol por 5 minutos. Inmediatamente se secó con mecheros por 10 minutos. Luego se resuspendió con 50 µl TE + 1µl ARNasa a 37 °C por 1 hora. Finalmente se conservó a -20 °C.



Figura 16. Raíces de espárrago con nódulos.

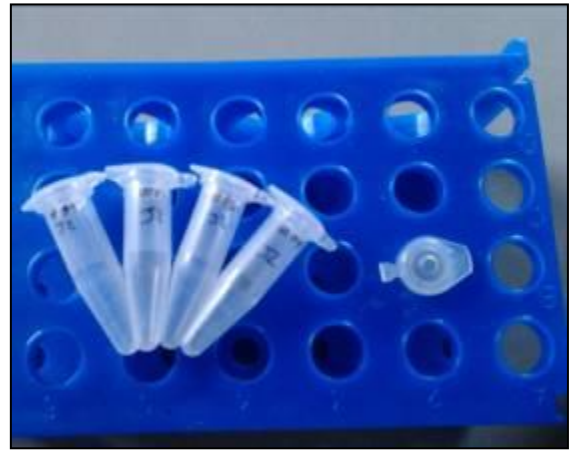


Figura 17. Tubos conteniendo nódulos.

b) Amplificación del gen 18S rRNA de nematodos.

Para cada muestra la región del gen ribosomal 18S rRNA del ADN fue amplificado por la técnica PCR (reacción en cadena de la polimerasa) usando los primers:

MeIF (5'-TACGGACTGAGATAATGGT-3') y MeIR (5'-GGTTCAAGCCACTGCGA-3'). La temperatura de hibridación utilizada fue de 56 °C. Una vez obtenido el producto, este fue observado por electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% (Fig. 22)

c) Extracción de ADN de bacterias endosimbiontes.

Se usaron 1,5 ml de cultivo bacteriano por cada una de las 8 cepas obtenidas (Fig. 18), que posteriormente se centrifugó a 14 000 rpm por 10 minutos, para luego descartar el sobrenadante, y se agregó 200 μ l de Buffer TENS; a continuación se adicionó 2 μ l de Proteinasa K y se incubó a 54 C° por 2 horas. Se agregó 400 μ l de Fenol/Cloroformo/Alcohol isoamílico (25:24:1) y se dió un ligero vortex (Fig. 19). Se centrifugó a 14 000 rpm por 15 minutos, y luego se recuperó el sobrenadante más 1 volumen de Cloroformo/Alcohol isoamílico (24:1), se dió un ligero vortex y se volvió a centrifugar a 14 000 rpm por 15 minutos para recuperar la fase superior y se colocó en un nuevo tubo. Luego se agregó 0,6 vol. de isopropanol más 0,1 vol. de Acetato de sodio 3M (pH 5,6) y se incubó a -20 C° por 1 hora. Pasada la hora se centrifugó a 14 000 rpm por 15 minutos, se descartó el sobrenadante, se agregó 1 ml de etanol al 70% (lavado x2). Se volvió a centrifugar a 14 000 rpm por 5 minutos, para después descartar el sobrenadante y secar. Se resuspendió en 50 μ l de TE y por último se agregó 1 μ l de ARNasa para incubar a 37C° por 30 minutos. Luego se conservó a -20°C.

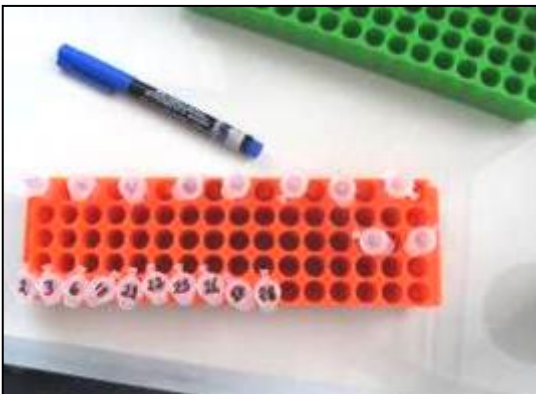


Figura 18. Cepas en caldo de cultivo.

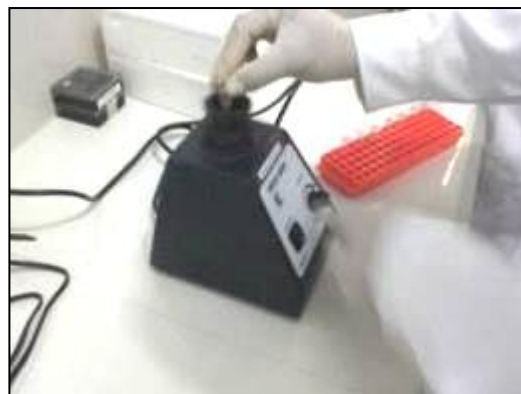


Figura 19. Homogenización de muestras en vortex.

d) Amplificación del gen 16S rRNA de bacterias endosimbiontes.

Para cada muestra la región del gen ribosomal 16S (rRNA) del ADN fue amplificada por la técnica PCR (reacción en cadena de la polimerasa) usando los iniciadores: 27F [forward] (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3') y 1492R [revers] (5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3').

Los componentes para la PCR fueron los siguientes para cada muestra: 22 µl de agua libre de nucleasa, 25 µl de Mastermix, 1 µl del primer 27F, 1 µl del primer 1492R y 1 µl de la muestra de ADN. La temperatura de hibridación utilizada en el termociclador fue de 55°C según el programa escogido (Fig. 20).

Una vez obtenido el producto PCR, se preparó un gel de agarosa al 1,5% y fue colocado en la cámara electroforética (Fig. 21). Las muestras se hicieron migrar en un gel de 1,5 % a 80 voltios por 40 minutos. Y se visualizó los amplicones compuestos de fragmentos de DNA con ayuda del Transiluminador de luz UV (Fig. 22).



Figura 20. Pantalla del termociclador con programa.



Fig.21: Cámara electroforética con el gel en su interior.

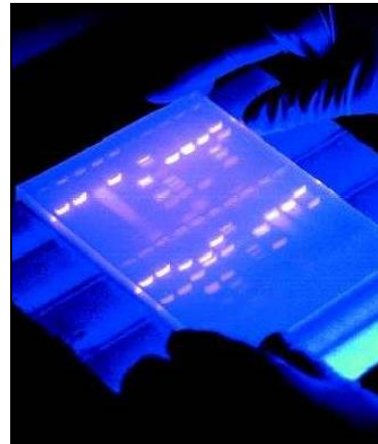


Fig. 22. Transiluminador UV.

e) Secuenciación nucleotídica de ADN, tanto de nematodos como de las bacterias endosimbiontes.

Las muestras de producto PCR, obtenidos a partir de la amplificación de los genes 18s rRNA y 16s rRNA para nematodos noduladores y bacterias respectivamente, fueron enviadas al laboratorio comercial norteamericano Macrogen para su secuenciación, con lo cual se pudo saber la secuencia nucleotídica de las regiones amplificadas por PCR, Contando las secuencias se procedió al alineamiento de las mismas

f) Alineamiento de secuencias nucleotídicas de ADN, tanto de nematodos como de las bacterias endosimbiontes.

El alineamiento de los resultados de la secuenciación se realizó con ayuda del software MEGA 5,05 (Fig. 23); para procesar la información de las secuencias de ADN. Esta es una forma de representar y comparar dos o más secuencias o cadenas de ADN, ARN, o estructuras primarias proteicas para resaltar sus zonas de

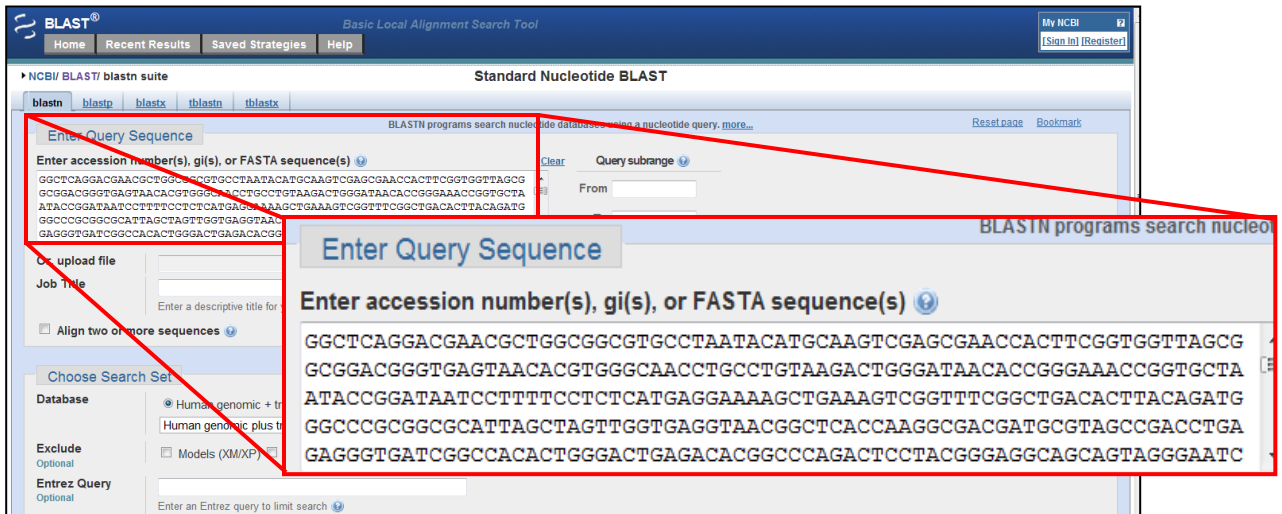


Fig.24: Software libre BLAST, en el que se ha ingresado una secuencia alineada, la cual está encerrado en la línea roja.

En estos resultados se pudo observar una tabla con una lista de nombres de los organismos que presentan cierto porcentaje de homología entre secuencias. BLAST es capaz de calcular la significación de sus resultados, por lo que nos provee de un parámetro para juzgar los resultados que se obtienen. El algoritmo encuentra las secuencias de la base de datos que tienen mayor parecido a la secuencia problema.

La página en la que se muestran los resultados, sugiere una lista de posibilidades la cual está organizada según sus valores de similitud con relación a la secuencia de nucleótidos en estudio. Para clasificar cada uno de los organismos, se tuvo como criterio: 1. La selección de aquellos organismos en la lista sugerida, que presentaban los porcentajes más altos de similitud (mayores valores de: “Max Ident”, “Max score” y “Query Coverage”) y 2. Organismo con mayor número de repeticiones en la lista, si era el caso de presentarse más de un valor de similitud idéntico. Para todos los casos de organismos en estudio, se escogieron valores de similitud mayores al 98% en la lista.

h) Análisis filogenético de las secuencias de bacterias.

Este análisis permitió la caracterización de las cepas bacterianas al obtener árboles filogenéticos en los que se pudo observar el grado de homología entre los organismos estudiados. Para cada árbol se usó la secuencia de un organismo no emparentado (*Erwinia herbicola*) para usarlo como contraste. Este análisis se elaboró con ayuda del software MEGA 5.05.

IV. RESULTADOS

1. Aislamiento de nematodos noduladores asociados al espárrago.

Tabla 1: Muestras de nematodos noduladores asociados al espárrago en la provincia de Virú – La Libertad, tomadas entre Noviembre del 2012 a Febrero del 2013.

	Métodos de extracción de Juveniles II	
	Método de extracción directa desde raíz.	Método de Baerman
Número de muestras	20 Muestras	20 Muestras
Peso de la muestra	5 g de raíz / Muestra	100 g de Suelo / Muestra
Promedio de Juveniles II aislados / Muestra	120 Juveniles II / Muestra	50 Juveniles II / Muestra

En el caso de extracción directa desde raíz, como se puede observar en la Tabla 1, de cada muestra se obtuvo un promedio de 120 juveniles de segundo estadio por cada 5 g de raíz.

Y para el método de Baerman, en cada muestra se obtuvo un promedio de 50 juveniles de segundo estadio por cada 100 g de suelo.

El total de nematodos aislados por cada muestra fue colocado en micro tubos de 1,5 ml para contar con un stock de cada una de las muestras, que posteriormente fueron utilizados en la extracción de los organismos endosimbiontes.

2. Aislamiento de bacterias: Cepario.

El tipo de muestra utilizado fue: Juveniles de segundo estadio

Numero de muestras: 20.

Numero de juveniles II / muestra: 20

Siembra: Por triplicado.

Tabla 2: Resultado de la siembra del extracto de nematodos noduladores asociados al espárrago en la provincia de Virú – La Libertad. Siembras realizadas entre Noviembre del 2012 a Febrero del 2013.

	Agar Nutritivo	PDA	Control Ambiental
Dilución	Dilución 10 ⁻³	Dilución 10 ⁻³	
Presencia de crecimiento bacteriano o de hongos	Si	Sin crecimiento	Sin crecimiento

Como resultado de la siembra no se observaron crecimientos de hongos, pero sí de colonias bacterianas, que después de realizar aislamientos a nuevas placas y obtener cultivos purificados, se describió su morfología y se les hizo tinción Gram, cuyo resultado se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 3: Morfología y características de las cepas bacterianas aisladas de nematodos noduladores asociados al espárrago en la provincia de Virú – La Libertad. Siembras realizadas entre Noviembre del 2012 a Febrero del 2013.

Cepa	Color	Borde	Tamaño	Tinción Gram
2-M	Crema	Regular	Mediano	Bacilos Gram (+)
3-M	Crema	Regular	Grande	Bacilos Gram (-)
21-M	Crema	Irregular	Mediano	Bacilos Gram (-)
22-M	Crema	Irregular	Mediano	Bacilos Gram (-)
25-M	Crema	Irregular	Mediano	Bacilos Gram (-)
26-M	Crema	Irregular	Grande	Bacilos Gram (-)
27-M	Crema	Irregular	Mediano	Bacilos Gram (-)
28-M	Crema	Irregular	Mediano	Bacilos Gram (+)

Después de observar minuciosamente cada cepa, se determinó que en todas las cepas se presentó el color crema, el borde regular solo en las cepas 2-M y 3-M, las cepas 3-M y 26-M muestran colonias grandes y respecto a la tinción Gram, solo las cepas 2-M y 28-M son Gram (+), lo cual es una característica del género *Bacillus*.

3. Amplificación del gen 18S rRNA de nematodos noduladores asociados al espárrago.

Después de la extracción de ADN de nematodos, se realizó PCR con los primers MeIF [forwar] y MeIR [revers], el producto obtenido se llevó a un gel de agarosa, se migró en la cámara electroforética y se observó la presencia de ADN, como se muestra a continuación:

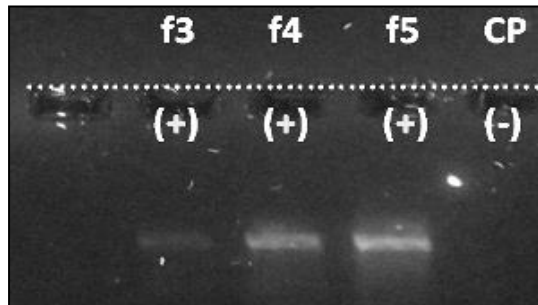


Figura 28. Amplicones de la región 18S de ADN ribosomal de nematodos en gel de agarosa visto en el transiluminador.

En la Fig. 28, se puede apreciar la presencia de tres amplicones que son el producto de la replicación de fragmentos de ADN de nematodos mediante el proceso de PCR. Los primers MeIF y MeIR están diseñados para amplificar en zonas conservadas de la cadena de ADN de nematodos del género *Meloidogyne*, por lo tanto los amplicones “f3”, “f4” y “f5” nos dan una confirmación previa al análisis de secuencias y “CP” es el control de PCR que se usa para descartar errores en el procedimiento. Nota: La intensidad observada en cada amplicon depende solo de la cantidad de ADN obtenido en la extracción del mismo.

4. Análisis de secuencias nucleotídicas de nematodos noduladores.

Después de alinear las secuencias con el programa Mega 5.05, estas se ingresaron en el software libre BLAST, para confirmar que el nematodo era del género *Meloidogyne*:

Tabla 4: Análisis en BLAST (Para nematodos).

Description	Max score	Total score	Query cover	Max ident
<u>Meloidogyne sp. 40 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	1607	1607	98%	100%
<u>Meloidogyne arenaria 5S, 18S, 5.8S, and 28S ribosomal RNA, complete sequence</u>	1613	1613	99%	99%
<u>Meloidogyne incognita strain SL 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	1609	1609	99%	100%
<u>Meloidogyne javanica 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	1596	1596	99%	99%
<u>Meloidogyne incognita strain YJ 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	1605	1605	99%	99%
<u>Meloidogyne incognita 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	1604	1604	98%	100%
<u>Meloidogyne floridensis small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	1600	1600	98%	100%
<u>Meloidogyne ethiopica isolate Gmaize 18S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	1600	1600	99%	99%
<u>Meloidogyne morocciensis small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	1600	1600	98%	100%
<u>Meloidogyne incognita strain 10 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	1600	1600	98%	100%

En la tabla se puede observar la confirmación del género *Meloidogyne* en la columna “Description”, En todos los casos se muestra una máxima identidad del 99 – 100%, observado en la columna “Max Ident”, lo que significa que las muestras analizadas tienen del 99 al 100% de homología con las secuencias referenciales, citadas por el BLAST (Columna “Description”).

5. Amplificación del gen 16S rRNA de bacterias.

En la figura 29, se puede ver el gel de agarosa colocado sobre el transiluminador de luz UV mostrando los amplicones del ADN respectivo para cada cepa bacteriana:

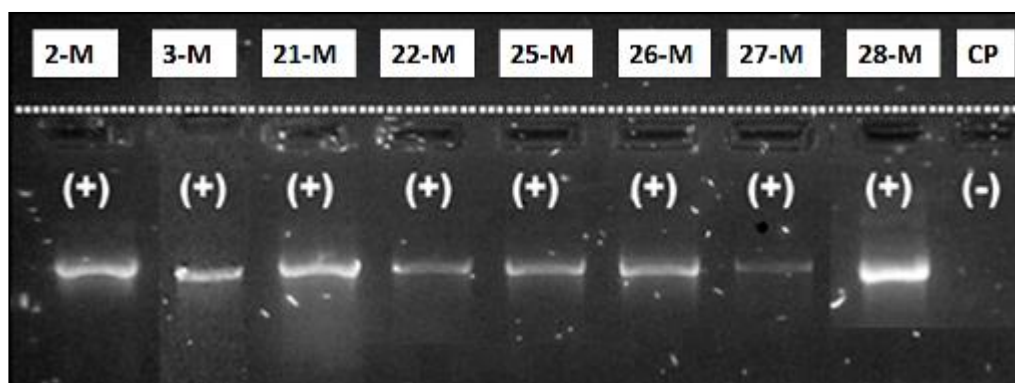


Figura 29. Gel de agarosa mostrando los amplicones de la región 16S de ADN ribosomal de las cepas bacterianas.

2-M, 3-M, 21-M, 22-M, 25-M, 26-M, 27-M y 28-M son los amplicones de las muestras de ADN de las cepas bacterianas, y CP es el control de PCR que descarta cualquier tipo de contaminación o error.

Este resultado indica que los primers 27F [forward] y 1492R [revers] han replicado correctamente las cadenas de ADN de cada cepa, permitiendo la visualización de los amplicones de ADN.

6. Análisis de secuencias de ADN de cada cepa bacteriana.

Resultados de identificación, obtenidos en el BLAST de cada una de las cepas bacterianas, de los cuales se puede conocer el género al que pertenecen las cepas (las tablas se interpretan de la misma forma en que se explica para el caso de nematodos).

- Tabla 5: Análisis en BLAST (Para Cepa 2-M)

Description	Max score	Total score	Query cover	Max ident
Bacillus aryabhatai strain KJ-W5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2748	2748	99%	100%
Bacillus aryabhatai strain R8-309 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2748	2748	99%	100%
Bacillus sp. 3406GBRRJ 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2748	2748	99%	100%
Bacillus sp. IHB B 4016 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2748	2748	99%	100%
Bacillus megaterium strain LAMA 262 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2748	2748	99%	100%
Bacillus subtilis isolate C14-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2748	2748	99%	100%
Bacillus megaterium 16S rRNA gene, isolate TS IW 36	2748	2748	99%	100%
Bacillus horikoshii strain RB10 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	2737	2737	99%	99%

- Tabla 6: Análisis en BLAST (Para Cepa 3-M)

Description	Max score	Total score	Query cover	Max ident
Pseudomonas fluorescens strain LMG 5329 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1816	1816	100%	99%
Pseudomonas sp. SAP195.3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1816	1816	100%	99%
Pseudomonas fluorescens A506, complete genome	1816	10887	100%	99%
Pseudomonas sp. LFY10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1814	1814	99%	99%
Pseudomonas poae strain Pier1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1814	1814	99%	99%
Pseudomonas fluorescens strain S1(7) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1814	1814	99%	99%
Pseudomonas sp. JM14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1814	1814	99%	99%

- Tabla 7: Análisis en BLAST (Para Cepa 21-M)

Description	Max score	Total score	Query cover	Max ident
<u>Pseudomonas fluorescens A506, complete genome</u>	2708	16238	100%	99%
<u>Pseudomonas sp. LFY10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	2702	2702	100%	99%
<u>Pseudomonas fluorescens strain LMG 5329 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	2702	2702	100%	99%
<u>Pseudomonas sp. SAP195.3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	2702	2702	100%	99%
<u>Pseudomonas poae gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: LB-Z1</u>	2697	2697	100%	99%
<u>Pseudomonas synxantha 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	2697	2697	100%	99%
<u>Pseudomonas sp. BSs20166 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	2702	2702	100%	99%
<u>Pseudomonas sp. 28zhy partial 16S rRNA gene, strain 28zhy</u>	2702	2702	100%	99%

- Tabla 8: Análisis en BLAST (Para Cepa 22-M)

Description	Max score	Total score	Query cover	Max ident
<u>Pseudomonas sp. SAP195.3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	2736	2736	99%	100%
<u>Pseudomonas sp. DVS13A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	2732	2732	99%	100%
<u>Pseudomonas poae strain Pier1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	2730	2730	99%	100%
<u>Pseudomonas fluorescens strain LMG 5329 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	2730	2730	99%	99%
<u>Pseudomonas synxantha 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	2730	2730	99%	100%
<u>Pseudomonas fluorescens A506, complete genome</u>	2730	16371	99%	99%
<u>Pseudomonas synxantha strain IHB B 1322 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	2723	2723	99%	99%

- Tabla 9: Análisis en BLAST (Para Cepa 25-M)

Description	Max score	Total score	Query cover	Max ident
<u>Acinetobacter johnsonii 16S rRNA gene, strain ATCC 17909</u>	2676	2676	99%	99%
<u>Acinetobacter sp. enrichment culture clone DTT.70PS 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	2673	2673	99%	99%
<u>Acinetobacter johnsonii strain 3B2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	2671	2671	99%	99%
<u>Acinetobacter sp. WAB1934 partial 16S rRNA gene, strain WAB1934</u>	2669	2669	99%	99%
<u>Acinetobacter sp. WAB1950 partial 16S rRNA gene, strain WAB1950</u>	2667	2667	99%	99%
<u>Acinetobacter sp. WAB1941 partial 16S rRNA gene, strain WAB1941</u>	2667	2667	99%	99%

- Tabla 10: Análisis en BLAST (Para Cepa 26-M)

Description	Max score	Total score	Query cover	Max ident
<u>Acinetobacter johnsonii 16S rRNA gene, strain ATCC 17909</u>	2708	2708	99%	99%
<u>Acinetobacter johnsonii strain 3B2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	2708	2708	99%	99%
<u>Acinetobacter sp. A1041 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	2706	2706	99%	99%
<u>Acinetobacter sp. WAB1941 partial 16S rRNA gene, strain WAB1941</u>	2706	2706	99%	99%
<u>Acinetobacter sp. WAB1934 partial 16S rRNA gene, strain WAB1934</u>	2706	2706	99%	99%
<u>Acinetobacter sp. enrichment culture done DTT.70PS 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	2704	2704	99%	99%

- Tabla 11: Análisis en BLAST (Para Cepa 27-M)

Description	Max score	Total score	Query cover	Max ident
<u>Acinetobacter johnsonii 16S rRNA gene, strain ATCC 17909</u>	2663	2663	100%	99%
<u>Acinetobacter johnsonii strain 3B2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	2663	2663	100%	99%
<u>Acinetobacter sp. WAB1941 partial 16S rRNA gene, strain WAB1941</u>	2663	2663	100%	99%
<u>Acinetobacter sp. CJ-S-R2A5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	2658	2658	99%	99%
<u>Acinetobacter sp. A1041 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	2662	2662	100%	99%
<u>Acinetobacter sp. WAB1950 partial 16S rRNA gene, strain WAB1950</u>	2662	2662	100%	99%

- Tabla 12: Análisis en BLAST (Para Cepa 28-M)

Description	Max score	Total score	Query cover	Max ident
<u>Bacillus arbutinivorans 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	2693	2693	99%	99%
<u>Bacillus arbutinivorans strain rif200874 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	2636	2636	99%	99%
<u>Bacillus sp. Ult-356 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	2630	2630	99%	99%
<u>Bacillus senegalensis strain RS6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	2601	2601	99%	98%
<u>Bacillus niacini strain YM1C7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</u>	2586	2586	99%	98%
<u>Bacillus sp. TSH18 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence</u>	2619	2619	98%	99%
<u>Bacillus bataviensis strain IDA1115 16S ribosomal RNA, partial sequence >emb AJ542508.1 Bacillus bataviensis</u>	2579	2579	99%	98%
<u>Bacillus novalis strain : LMG 21837 16S ribosomal RNA, partial sequence >emb AJ542512.1 Bacillus novalis pa</u>	2553	2553	99%	98%

Tablas. 5 - 12: Resultados del análisis BLAST (Para cepas bacterianas)

En todas las tablas del 5 al 12 se puede observar la lista de secuencias de organismos que poseen homología con la correspondiente secuencia en estudio, esta lista se encuentra en la comuna “Description”.

En todos los casos se muestra una máxima identidad del 99 – 100%, observado en la columna “Max Ident”, lo que significa que las muestras analizadas tienen de 99 a 100% de homología con las secuencias referenciales, citadas por el BLAST (Columna “Description”). Estos resultados permiten la identificación de las cepas a nivel de género, las cepas 2-M y 28-M pertenecen al género *Bacillus*, las cepas 25-M,

26-M y 27-M pertenecen al género *Acinetobacter*, y las cepas 3-M, 21-M y 22-M pertenecen al género *Pseudomonas*.

7. Análisis bioinformáticos para árboles filogenéticos de bacterias.

Luego de revisar los resultados obtenidos en BLAST, se elaboró un árbol filogenético, para la caracterización de cada grupo de cepas bacterianas, definido por el grado de homología entre las secuencias de las bacterias en estudio según la estructura genética, obteniendo tres árboles.

En cada árbol se muestra las cepas bacterianas en estudio (acompañadas de un cuadrado de color azul), varios organismos proporcionados por el software libre BLAST, y el organismo contraste (*Erwinia herbicola*) (acompañado de un triángulo de color rojo), el organismo de contraste es una bacteria de un género diferente a todas las demás. Todos estos componentes permiten identificar el grado de homología que existe entre las secuencias nucleotídicas de los organismos proporcionados por el software y las cepas bacterianas en estudio.

El software MEGA 5.05 fue el utilizado en la elaboración de árboles filogenéticos, este software trabajó en base a análisis comparativos de las características estructurales de las secuencias nucleotídicas ingresadas. Para la formación de cada árbol, el software creó 10 000 posibles árboles, que mediante el análisis bioinformático del propio software se fusionaron para formar un solo árbol que contiene las características más adecuadas para representar la homología entre secuencias que comparten un mismo origen evolutivo.

Árbol filogenético *Bacillus* :

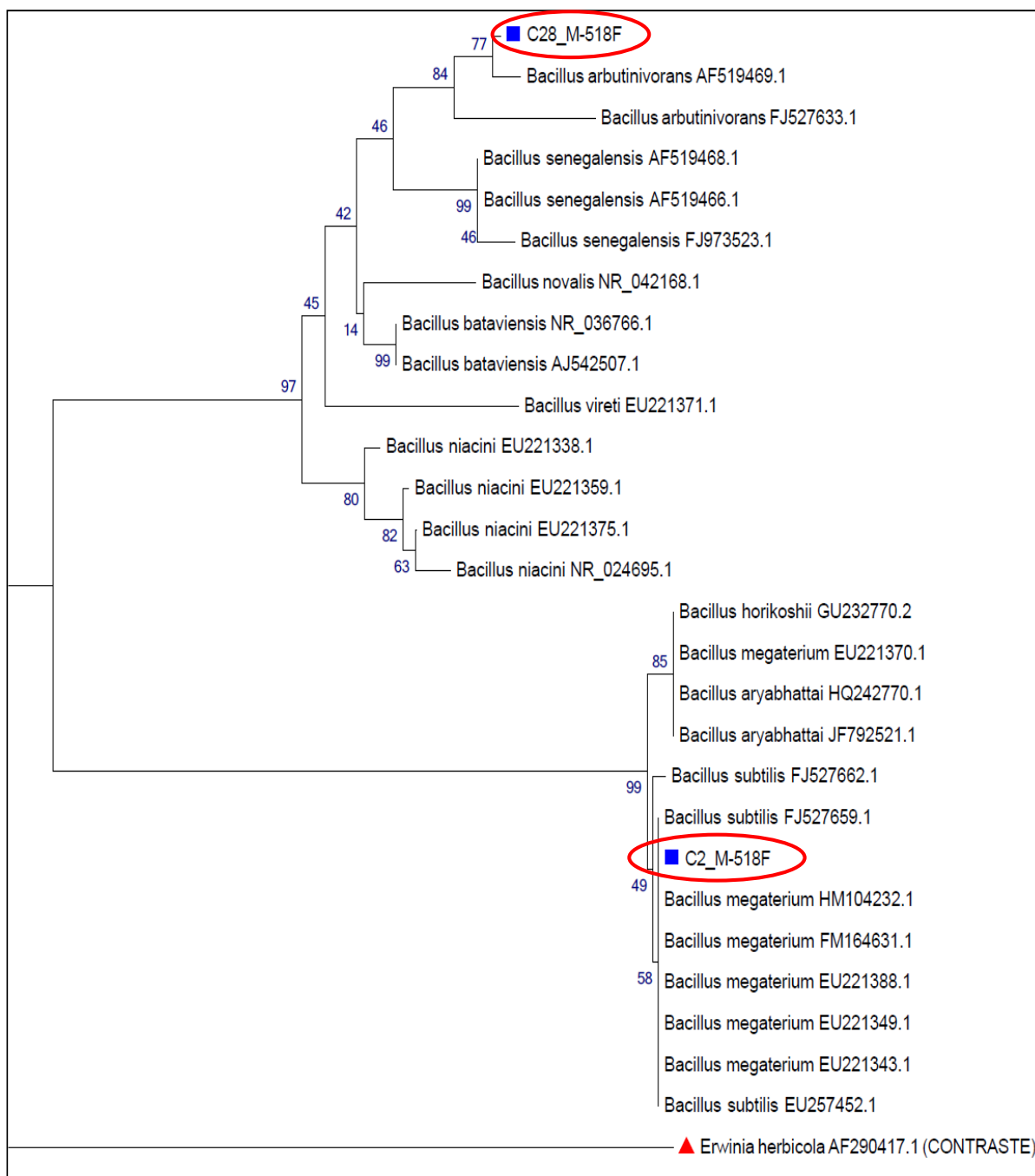


Fig. 30: Árbol filogenético de cepas afines con el género *Bacillus*.

En este árbol se puede observar que la cepa 28-M está estrechamente relacionada con la bacteria *Bacillus arbutinivorans*, y la cepa 2-M tiene mayor homología con *Bacillus megaterium*.

Árbol filogenético *Pseudomonas* :

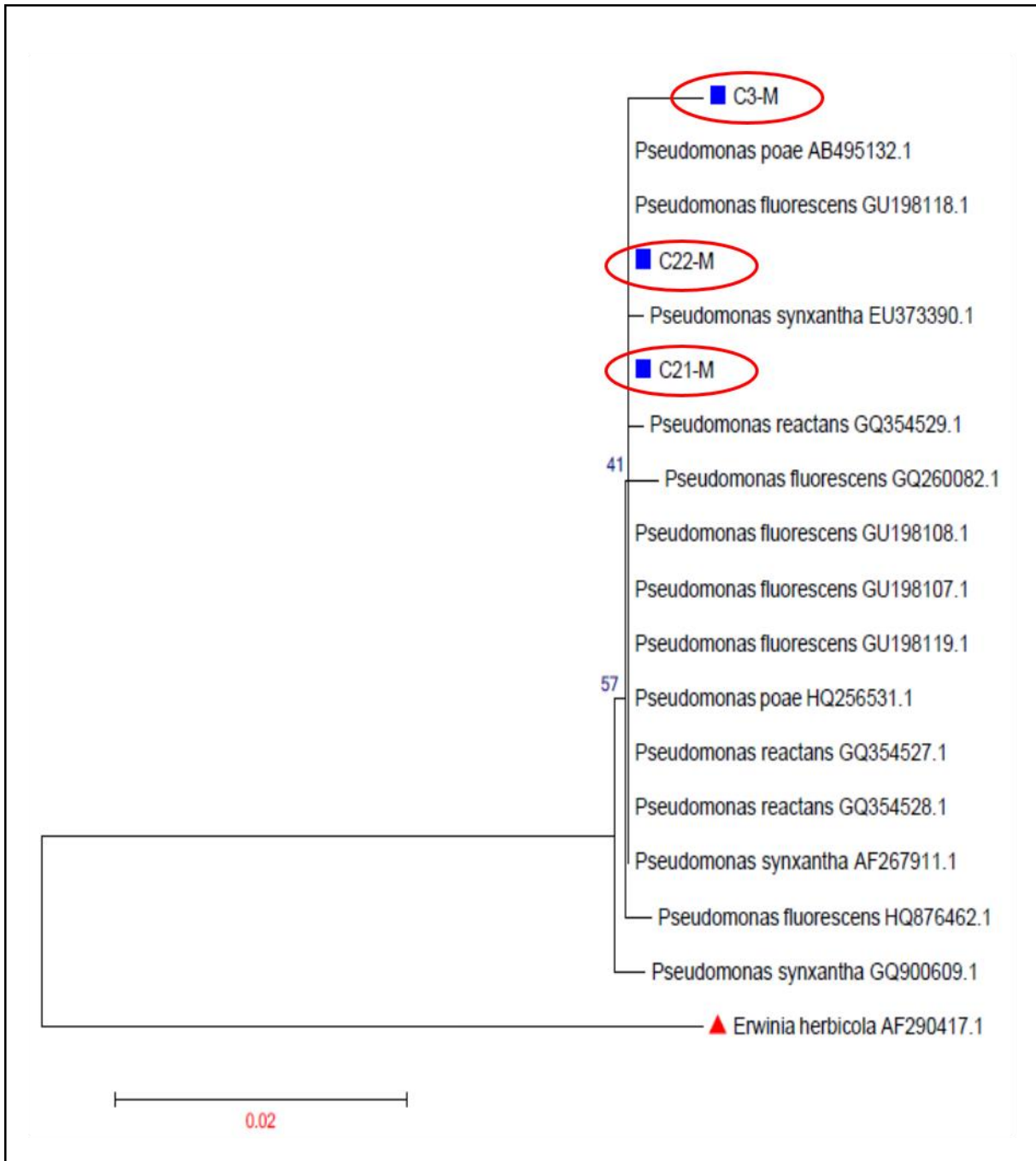


Fig. 31: Árbol filogenético de cepas afines con el género *Pseudomonas*.

En el árbol se puede ver la homología existente entre las cepas 3-M, 21-M y 22-M con respecto a las bacterias *Pseudomonas poae*, *P. fluorescens*, *P. synxantha* y *P. reactans*.

Árbol filogenético *Acinetobacter*.

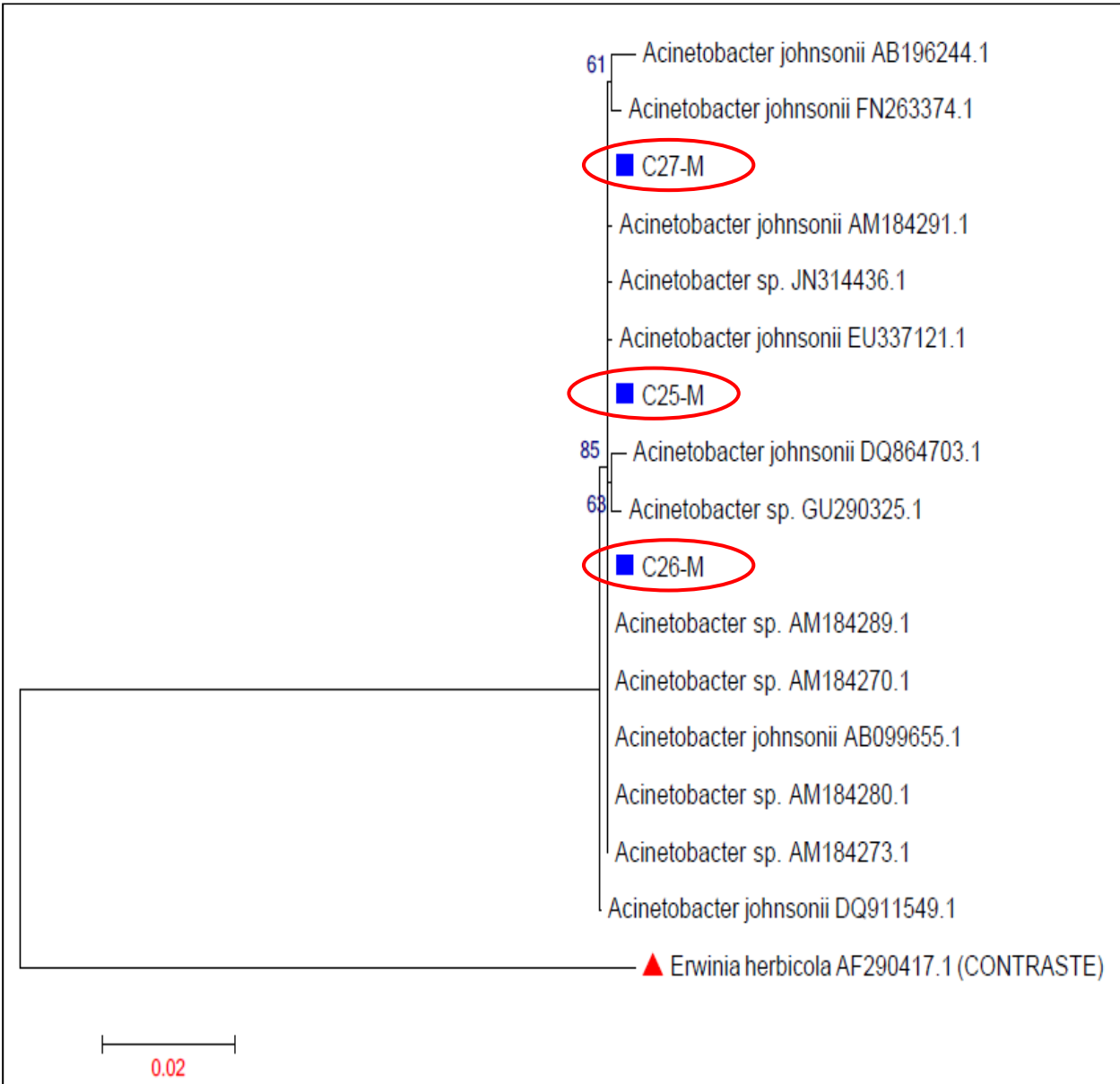


Fig. 32: Árbol filogenético de cepas afines con el género *Acinetobacter*.

En este caso no se tiene una referencia de una especie específica para cada cepa, esto se debe a la poca disponibilidad de secuencias de este género de bacteria en la base de datos del BLAST.

V. DISCUSIÓN

Mediante herramientas moleculares se logró identificar a 8 bacterias endosimbiontes del nematodo nodulador (*Meloidogyne* spp.), con esto se produjo una serie de comparaciones con las metodologías y resultados de varios autores. El procedimiento de extracción de ADN de nematodos directo desde raíz utilizado en este trabajo y propuesto por Hu *et al.*, 2011, permitió extraer correctamente ADN de la forma más sencilla, sin necesidad de utilizar metodologías de aislamiento de nematodos individuales previo a la extracción de ADN, esto evita pérdida de tiempo y recursos, además de que permitió obtener buenos resultados. La identificación de los nematodos a nivel de género fue correcta, pues los primers MelF [forward] y MelR [reverse] hibridados a la temperatura de 56 °C están diseñados para amplificar en zonas conservadas de la cadena de ADN de nematodos del género *Meloidogyne*, por lo tanto todos los resultados positivos garantizan la confirmación del género. Como referencias adicionales de metodologías de extracción de ADN de nematodos, tenemos la de Adam *et al.*, 2007, que propusieron la extracción de nematodos individuales machacados; asimismo Waeyenbegue *et al.*, 2000 recomendaron la extracción de nematodos individuales pero cortados en secciones.

La extracción de bacterias endosimbiontes, tuvo como base la metodología utilizada en el estudio de un organismo modelo (*Caenorhabditis elegans*) en la investigación de Troemel *et al.*, 2008, quienes aislaron una bacteria endosimbionte patógena intracelular del intestino del nematodo de vida libre *Caenorhabditis elegans*, esta metodología garantizó que los nematodos estuvieran libres de

impurezas que podían ser fuente de contaminación, por lo que permitió una extracción de bacterias confiable. A pesar de que la referencia es adecuada, se tuvieron algunas consideraciones adicionales. Por eso se decidió usar una desinfección previa con alcohol para los nematodos, para asegurar que las bacterias extraídas y cultivadas no fueran producto de contaminación externa del nematodo. Además podemos contrastar con las referencias en las que se mencionan organismos endosimbiontes de otros nematodos, como las descritas por: Noel y Atibalentja, 2006, en la que mencionan bacterias endosimbiontes no cultivables en nematodos del género *Globodera* y *Heterodera*; por su parte Vandekerckhove *et al.*, 2000, reportan 3 especies de bacterias no cultivables en 3 especies de nematodos del género *Xiphinema*; otro trabajo es el de Giblin *et al.*, 2003 en el que describieron una bacteria, endoparásita obligada del pseudoceloma de *Belonolaimus longicaudatus*. Así como también tenemos la referencia de Hodgking y Partridge, 2008, que reportan a una bacteria intracelular en el nematodo de vida libre *Caenorhabditis elegans*; y por ultimo Peteira *et al.*, 2008, realizó la identificación de nematodos entomopatógenos y sus bacterias simbiotes.

Los resultados de la amplificación del gen 16s rRNA indican que los primers 27F [forward] y 1492R [revers] hibridados a 55°C han replicado correctamente las cadenas de ADN de cada cepa en el proceso de PCR, debido a que estos primers son de regiones altamente conservadas para procariontes, permitiendo luego los análisis bioinformáticos realizados para la caracterización. Los primers de este tipo son confiables y han sido utilizados en diferentes investigaciones como la de Fan *et al.*, 2012, por lo tanto la identificación de bacterias es correcta.

Para la caracterización de las bacterias se procedió con la obtención de árboles filogenéticos de las cepas bacterianas que nos permiten ver no solo el género al que pertenece cada una de las bacterias encontradas, sino también con que especie podrían compartir homología estructural. Haciendo uso de las características estructurales de las cadenas de ADN de las bacterias en estudio se logró caracterizar las mismas para emparentarlas con las bacterias homologas proporcionadas en la base de datos del BLAST.

Algunas de las cepas obtenidas en este trabajo de investigación podrían tener importancia en el control de *Meloidogyne*. Así tenemos la referencia de Márquez, 2006, quien menciona que en el género *Bacillus* se conocen especies que tienen efectos nematocidas contra el género *Meloidogyne*, en dicha investigación se realizaron bioensayos con poblaciones de *M. incognita* extraídas de plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) procedentes de cultivos organopónicos de Ciudad de la Habana, así también Terefe, 2009, menciona efectos nematocidas de bacterias del género *Bacillus* sobre *Meloidogyne incognita* en condiciones de laboratorio, invernadero y en condiciones de campo sobre plantas de tomate. De la misma forma hay referencias de bacterias del género *Pseudomonas* con efectos nematocidas sobre *Meloidogyne incognita*, estos efectos fueron evaluados in vitro e in vivo en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) (Wahla, 2012). Pero del género *Acinetobacter* solo se conocen especies de importancia ecológica.

El presente trabajo de investigación ha proporcionado información de una parte poco estudiada dentro de las alternativas de control biológico de nematodos fitopatógenos, en este caso específicamente el género *Meloidogyne*, pues da a conocer algunas de las bacterias que podrían interactuar con el nematodo nodulador.

VI. CONCLUSIONES

- La aplicación de Cloruro de sodio en el proceso de extracción de bacterias, es fundamental para asegurar la ruptura del cuerpo de los nematodos y la obtención de un extracto de las partes internas del nematodo.
- El método de extracción de ADN de nematodos noduladores directamente desde la raíz, resultó ser práctico y sencillo respecto a otros mencionados en la literatura, por lo que debe ser considerado en trabajos relacionados.
- Para cada una de las muestras de ADN de nematodos los primers MeIF (5'-TACGGACTGAGATAATGGT-3') y MeIR (5'-GGTTCAAGCCACTGCGA-3') amplificaron correctamente. Y los análisis de secuencias mostraron que en todos los casos los nematodos pertenecían al género *Meloidogyne*. Por lo tanto se confirmó la presencia de nematodos noduladores mediante la identificación molecular de los mismos.
- Como resultado del reaislamiento y purificación de las colonias bacterianas observadas, se obtuvo las siguientes cepas: 2-M, 3-M, 21-M, 22-M, 25-M, 26-M, 27-M y 28-M.
- Luego de la extracción de ADN de bacterias, replicación por PCR y los análisis de secuencias; se identificaron correctamente lo siguiente: las cepas 2-M y 28-M pertenecientes al género *Bacillus*, las cepas 25-M, 26-M y 27-M pertenecientes al género *Acinetobacter*, y las cepas 3-M, 21-M y 22-M pertenecientes al género *Pseudomonas*.

- La caracterización molecular de las cepas mediante la elaboración de árboles filogenéticos se realizó correctamente debido a que el software Mega 5.05 realizó la cantidad suficiente de posibles árboles (10 000) para el análisis comparativo de secuencias nucleotídicas, que garantizan la confiabilidad de los resultados.

VII. RECOMENDACIONES

- Incluir como parte del procedimiento de extracción de organismos endosimbiontes, el uso de la desinfección de nematodos con alcohol y someterlos por un tiempo al cloruro de sodio.
- Agregar en el árbol filogenético un organismo lejanamente emparentado para la elaboración del mismo, ya que esto será el contraste para el análisis.
- Continuar con este tipo de trabajos de investigación por parte de otros alumnos a través de la ejecución de proyectos de tesis relacionados al tema. Ya que al ser este estudio el primero en su tipo realizado en la Universidad Nacional de Tumbes, abre un abanico de posibilidades para futuros trabajos que se desarrollen en la misma línea y que permitan conocer aspectos más específicos con fines de control biológico.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

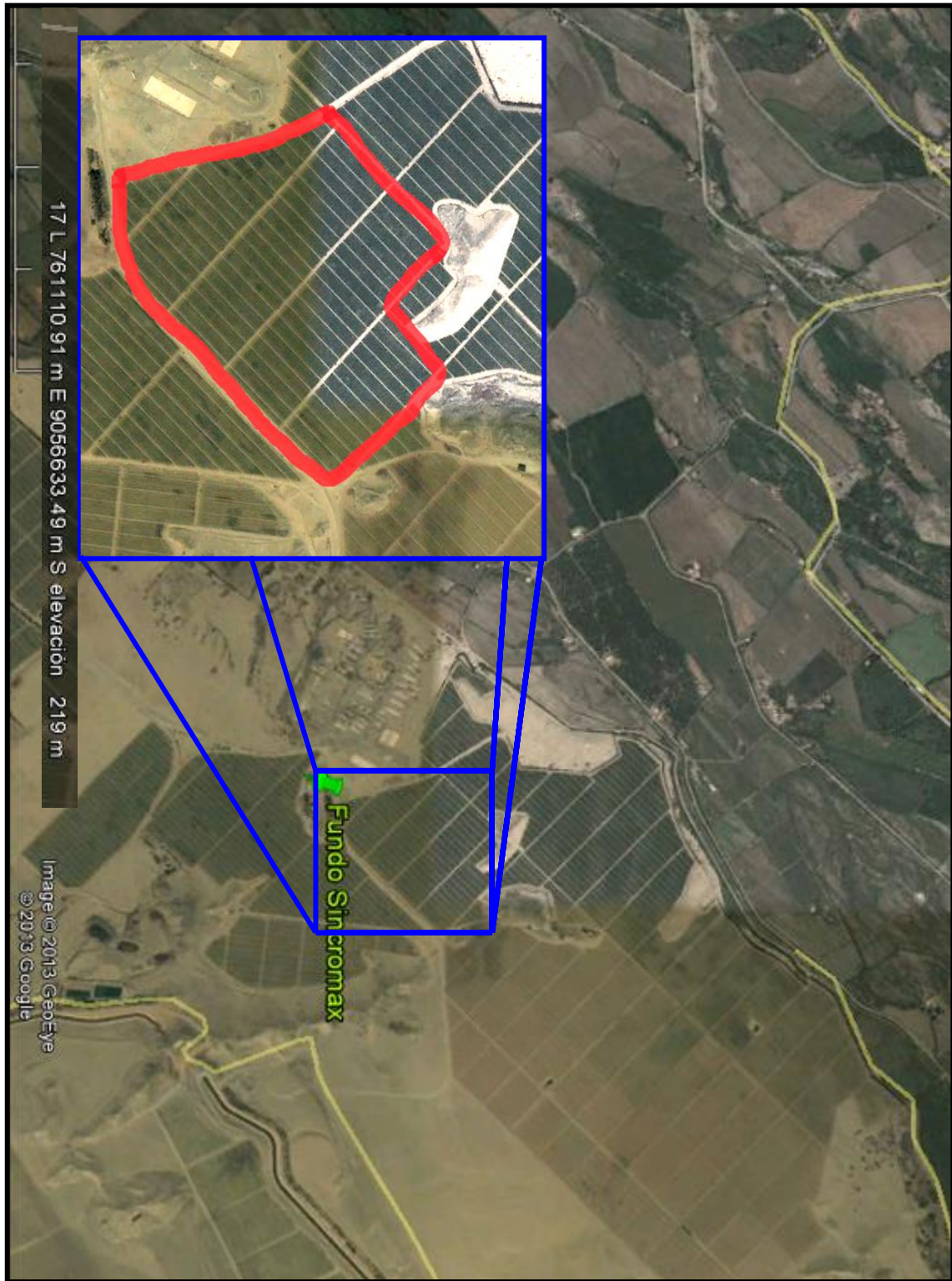
- Adam, M., Phillips, M., Blok, V. (2007). Molecular diagnostic key for identification of single juveniles of seven common and economically important species of root-knot nematode (*Meloidogyne spp.*) *Plant Pathol* 56, 190-197.
- Agrios, G. (2005). *Plant pathology*. 5 ed. Elsevier Academic Press California, USA. 922 pp.
- Arias, Y., González, I., Rodríguez, M., Rosales, C., Suárez, Z., Peteira, B. (2009). Aspectos generales de la interacción tomate (*Solanum lycopersicon* L.) – *Meloidogyne incognita*. Vol.24. 1-13pp.
- Coenye, T., Vandamme, P. (2003). "Heterogeneidad intragenómica entre varios operones ribosomales 16S de ARN en genomas bacterianos secuenciados". *FEMS Microbiol. Lett* 228 (1):.. 45-49pp.
- Fan, J., Yang, G., Zhao, H., Shi, G., Geng, Y., Hou, T., and Tao, K. (2012). Isolation, identification and characterization of a glyphosate-degrading bacterium, *Bacillus cereus* CB4, from soil. Key Laboratory of Bio-resources and Eco-environment of Ministry Education, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu. China. Vol. 58. 263-271pp.
- Gheysen, G., Mitchum, M. (2009). Molecular insights in the susceptible plant response to nematode infection. In *Plant Cell Monographs: Cell Biology of Plant Nematode Parasitism*. Edited by Berg RH, Taylor CG. Springer; 45-82pp.
- Gheysen, G., Mitchum, M. (2011). How nematodes manipulate plant development pathways for infection. *ELSEVIER Ltd*. Vol.14:1-7pp.
- Giblin, R., Williams, D., Dickson, D., Brito, J., Becker, J., Preston, J. (2003). '*Candidatus Pasteuria usgae*' sp. nov., an obligate endoparasite of the phytoparasitic nematode *Belonolaimus longicaudatus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol.53, 197–200pp.

- Hodgkin, J., Partridge, F. (2008). *Caenorhabditis elegans* Meets Microsporidia: The Nematode Killers from Paris. PLOS Biology. Vol.6. 2634-2637pp.
- Hu M.; X, K. Zhuo, J. Liao. (2011). Multiplex PCR for the Simultaneous Identification and Detection of *Meloidogyne incognita*, *M. enterolobii* and *M. javanica* using DNA Extracted Directly from Individual Galls. Laboratory of Plant Nematology, South China Agricultural University, Guangzhou, China.
- Jatala, P. (1986). Biological control of plant-parasitic nematodes. Annu Rev Phytopathol Vol 24: 453–489pp.
- Klug, W.S; Cummings, M.R. (1999). Conceptos de Genética. Trad. por: Ménsua, JL. y Bueno, D. 5ª edición. Prentice Hall. Iberia, S.R.L. Madrid, España. 814 pp.
- Márquez, M., Fernández, E. (2006). Selección de cepas de *Bacillus thuringiensis* con efecto nematocida. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica) No. 78. 7pp.
- Meyer A., C. Todt, Mikkelsen NT & B. Lieb (2010). "Fast evolución 18S rRNA secuencias de Solenogastres (Mollusca) resistir estándar amplificación por PCR y dar nuevas pistas sobre la heterogeneidad molusco tasa de sustitución".BMC Evolutionary Biology 10: 70pp.
- Noel, G., Atibalentja, N. (2006). '*Candidatus Paenicardinium endonii*', an endosymbiont of the plant-parasitic nematode *Heterodera glycines* (Nemata: Tylenchida), affiliated to the phylum Bacteroidetes. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Vol.56, 1697–1702pp.
- Perera M., Vastone V., Jones M. (2005). A novel approach to identify plant parasitic nematodes using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Wiley InterScience. Vol.19, 1454 – 1460pp.

- Perry, R., Moens, M. (2006). Plant Nematology. 1ra edición. CABI, UK. 48pp.
- Perry, R., Moens, M. (2011). Introduction to plant-parasitic nematodes: modes of parasitism. In Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions. Edited by Jones J, Gheysen G, Fenoll C. Springer. 3-20pp.
- Peteira, B., Rodriguez, M., Rosales, C., Salazar, E. (2008). Uso de técnicas moleculares en la identificación de nematodos entomopatógenos y sus bacterias simbiotes. Revista digital del instituto nacional de investigaciones agrícolas, Venezuela. 16pp.
- Pignome, M., Greth, K., Cooper, J., Emerson, D., Tang, J. (2006). Identification of Mycobacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time-of-Flight Mass Spectrometry. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 44, N°6: 1963-1970pp.
- Powers, T. (2004). Nematode Molecular Diagnostics: From Bands To Barcodes. Annual Reviews Phytopathology. Department of Plant Pathology, University of Nebraska. Lincoln, Nebraska, USA. Vol 42: 367 – 83pp.
- Punja, Z. ; S. De Boer.; H. Sanfaçon. (2007). Biotechnology and. Plant diseases Management. Biddles Ltd, King's Lynn. UK. 590pp.
- Taylor, A.L., Sasser J.N. (1983). Biología, identificación y control de los nematodos de nódulo de la raíz (*Especies de Meloidogyne*). Carolina del norte, USA. 111pp.
- Terefe, M., Tefera, T., Sakhuja, P. (2009). Effect of a formulation of *Bacillus firmus* on root-knot nematode *Meloidogyne incognita* infestation and the growth of tomato plants in the greenhouse and nursery. Haramaya University, College of Agriculture, Department of Plant Sciences. Dire Dawa, Ethiopia. 94-99pp.

- Tian, B., Yang, J., Zhang, K. (2007). Bacteria used in the biological control of plant-parasitic nematodes: populations, mechanisms of action, and future prospects. Federation of European Microbiological Societies Published by Blackwell Publishing Ltd. 197-213pp.
- Trigiano, R., Windham, M., Windham, A. (2004). Plant pathology concepts and laboratory exercises. CRC Press. Florida, USA. 702pp.
- Troemel, E., Félix, M., Whiteman, N., Barrière, A., Ausubel, F. (2008). Microsporidia Are Natural Intracellular Parasites of the Nematode *Caenorhabditis elegans*. PLOS Biology. Vol 6. 2736-2752pp.
- Vandekerckhove, T., Willems, A., GILLIS M., COOMANS, A. (2000). Occurrence of novel verrucomicrobial species, endosymbiotic and associated with parthenogenesis in Xiphinema americanum group species (Nematoda, Longidoridae). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Vol. 50, 2197–2205pp.
- Vejl, P.; Skupinová, S.; Sedlák, P.; Domkářová, J. (2002). Identification of PCN species (*Globodera rostochiensis*, *G. pallida*) by using of ITS-1 region's polymorphism. Rostlinná Výroba. Czech University of Agriculture in Prague & Potato Research Institute, Havlíčkův Brod, Czech Republic. Vol. 48 (11): 486 – 489pp.
- Waeyenberge, L., A. Ryss, M. Moens, J. Pinochet, and T. C. Vrain. (2000). Molecular characterization of 18 *Pratylenchus* species using rDNA restriction fragment length polymorphism. PLOS Biology. Vol 3. 1462-1468pp.
- Wahla, V., Maheshwari, D., Bajpai. (2012). Nematicidal fluorescent pseudomonads for the in vitro and in vivo suppression of root knot (*Meloidogyne incognita*) of *Capsicum annuum* L. Society of chemical industry. Republic of Korea. 8pp.

ANEXOS



ANEXO 1. Ubicación del área muestreada (Marcada en rojo). Coordenadas UTM 17 L 761110.91 m E 9056633.49 m S