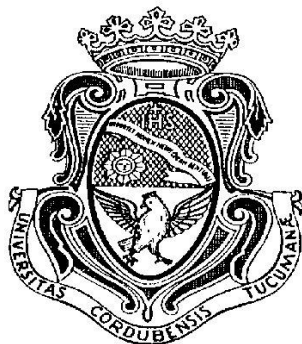


Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales
Carrera de Ciencias Biológicas



TESINA PARA OPTAR AL TÍTULO DE BIÓLOGO

POTENCIAL NEMATICIDA DE UN METABOLITO SECUNDARIO PRODUCIDO
POR *SERRATIA* SP. (ENTEROBACTERIALES: ENTEROBACTERIACEAE) SOBRE
NACOBBUS ABERRANS (TYLENCHIDA: PRATYLENCHIDAE)

Tesinista: Laura Gomez Valdez

Firma:

Directora: Dra. Paola Lax

Firma:

Co-director: Dr. Juan Rondan Dueñas

Firma:

Centro de Zoología Aplicada

2016

POTENCIAL NEMATICIDA DE UN METABOLITO SECUNDARIO PRODUCIDO
POR *SERRATIA* SP. (ENTEROBACTERIALES: ENTEROBACTERIACEAE) SOBRE
NACOBBUS ABERRANS (TYLENCHIDA: PRATYLENCHIDAE)

Tribunal examinador

Dra. María Alejandra Bertolotti Firma:

Dra. Susana Cagnolo Firma:

Dr. Sebastián Dambolena Firma:

• Calificación:

• Fecha:

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a mi Directora, la Dra. Paola Lax, sus conocimientos, sus orientaciones y su persistencia durante esta etapa. A mi Co-director, el Dr. Juan Rondan Dueñas, por su buena predisposición y gentileza. Al Dr. Marcelo E. Doucet, por su generosidad y ayuda desinteresada.

Al Director del Centro de Zoología Aplicada, Dr. Gerardo Leynaud, por permitirme realizar mi tesina en ese lugar.

A mi familia, por el apoyo y enorme paciencia que me han tenido durante estos años de carrera. A María y Raúl, mis papás, gracias por cada consejo, por su ayuda y por cada una de sus palabras que me guiaron durante mi vida.

A mi hermana Mara, mi cuñado Alberto y mi sobrino Agustín, por estar en las buenas y en las malas, por escucharme, por acompañarme, gracias.

A Tiago, por su amor y comprensión, por estar conmigo en este tiempo tan importante para mí, su compañía fue fundamental.

A mis amigos, mi banda, Debi, Ceci, Cele, Luni, Nahu y Marquitos, por su incondicional amistad, por compartir mis horas grises, mis momentos felices, por las mil y una historias que guardo en mi corazón, porque sin ustedes este camino no hubiera sido lo mismo.

A mis compañeras de laboratorio, Mile y Naty, por sus consejos y por responder mis dudas con la mejor onda; a Noe y Pía, también fueron parte de esta etapa; a Nicolás, por ayudarme cuando lo necesité.

Gracias a todos y cada uno, hoy puedo sentir la felicidad de haber llegado al final de mi carrera como bióloga. Me llevo la satisfacción de un objetivo cumplido, pero ante todo, el cariño, respeto y gratitud hacia todos ustedes.

RESUMEN

El nematodo fitófago *Nacobbus aberrans* genera agallas en las raíces de las plantas que parasita. Afecta principalmente a los cultivos de papa, tomate, remolacha y pimiento; es considerada una plaga de importancia cuarentenaria. Debido al impacto negativo que ocasionan los plaguicidas a la salud humana y al ambiente, se ha incrementado la búsqueda de alternativas de manejo biológico. Rizobacterias del género *Serratia* han sido eficientes para reducir poblaciones de nematodos parásitos de plantas. Algunas especies pueden producir un pigmento rojo llamado prodigiosina que ha mostrado ser antagonista de diferentes organismos; hasta el momento, sólo un estudio evaluó el efecto *in vitro* de ese metabolito secundario frente a dos especies de nematodos fitófagos. En el presente trabajo, se analizó el potencial nematicida de prodigiosina obtenida de una cepa de *Serratia* sp. sobre *N. aberrans*. En primer lugar, en condiciones *in vitro* se estimó a las 24 y 48 h, la mortalidad de juveniles de segundo estadio (J2) provenientes de Río Cuarto (Córdoba) y Santa María (Catamarca) frente a diferentes dosis (3, 6, 9, 12, 24 y 36 µg/ml) del metabolito. Se realizaron 4 réplicas por tratamiento y cada uno se repitió 3 veces. En base a los porcentajes obtenidos se definieron las dosis letales 50 (DL₅₀) y 90 (DL₉₀). En segundo lugar, bajo condiciones de invernadero se aplicaron ambas DL en suelo y, 12 días después de la inoculación, se contabilizaron los J2 (Río Cuarto) que penetraron en raíces de tomate; cada tratamiento tuvo 8 repeticiones. Los resultados de ambas experiencias se analizaron mediante Modelos Lineales Generalizados Mixtos. La DL₅₀ para Río Cuarto y Santa María fue de 12,4 y 13,2 µg/ml, respectivamente, mientras que la DL₉₀ fue de 24,9 µg/ml (ambas poblaciones). El porcentaje de mortalidad de los nematodos aumentó en función del tiempo y la concentración del metabolito; el 100% se alcanzó a la mayor dosis (36 µg/ml) a las 24 h (Río Cuarto) y 48 h (Santa María). Este efecto antagónico, se corroboró con los resultados obtenidos en la experiencia con plantas de tomate. La aplicación de la prodigiosina en suelo redujo el ingreso de los J2 en los tejidos radicales del hospedador en un 59% y 83% al suministrar una concentración de 12,4 y 24,9 µg/ml, respectivamente. En base a los resultados del presente trabajo, la prodigiosina obtenida de la cepa de *Serratia* sp. podría representar un método alternativo de control biológico de poblaciones de *N. aberrans*. Sin embargo, sería de interés continuar investigando las potencialidades de este

pigmento, incorporando otras cepas bacterianas para seleccionar aquellas más patógenas, así como realizar estudios a mayor escala, tanto en invernadero como a campo.

Palabras Clave: *Nacobbus aberrans*, nematodo fitófago, *Serratia*, prodigiosina, potencial nematocida.

INTRODUCCIÓN

La especie *Nacobbus aberrans*

El nematodo fitófago, *Nacobbus aberrans*, es un endoparásito sedentario que genera agallas en las raíces de las plantas que ataca. La especie es nativa del continente americano; está presente en Argentina, Bolivia, Chile, Ecuador, Estados Unidos, México y Perú (EPPO, 2011). Posee hábitos polífagos y su rango de hospedadores es amplio; parasita aproximadamente 84 especies de plantas cultivadas y malezas, pertenecientes a 18 familias (Manzanilla-López *et al.*, 2002; Doucet & Lax, 2005). Los principales cultivos atacados son: papa (*Solanum tuberosum*), tomate (*Solanum lycopersicum*), remolacha (*Beta vulgaris*), pimiento (*Capsicum annuum*) y poroto (*Phaseolus vulgaris*); las pérdidas que genera oscilan dependiendo del hospedador: 35% (poroto), 50-90% (tomate) y alcanzar un 80% (papa) (Manzanilla-López *et al.*, 2008). Este nematodo es considerado una plaga de importancia cuarentenaria debido a los severos daños que ocasiona a la agricultura (EPPO, 2011) y se encuentra bajo regulaciones fitosanitarias internacionales para evitar su introducción en otros países (CABI & EPPO, 1997).

La especie es anfimíctica y la duración de su ciclo de vida varía según la temperatura y la disponibilidad del alimento, pudiendo completarse en aproximadamente 37-48 días a 22-24°C (Costilla & Ojeda, 1985) (Figura 1). Dentro del huevo, el juvenil de primer estadio (J1) muda a segundo estadio (J2) que emerge y busca al hospedador; en las raíces, se alimenta del contenido de las células del parénquima cortical que perfora con su estilete. A medida que crece, muda a tercer (J3) y cuarto estadio juvenil (J4); este último, luego de otra muda, da lugar a un macho o hembra inmadura (ambos filiformes). Esa hembra ingresa a los tejidos radicales y se aloja a proximidad del cilindro central; allí se desencadena una serie de alteraciones a nivel celular que forman la agalla y el sitio de alimentación del parásito (síncitio). A medida que se nutre, va perdiendo su aspecto filiforme y adquiere una forma ahusada, transformándose en hembra madura. La fecundación ocurriría cuando la hembra se convierte en sedentaria (Inserra *et al.*, 1983); produce una matriz mucilaginosa que puede contener alrededor de 400-800 huevos, denominada masa de huevos, que es depositada a través de un canal en la superficie de la agalla, en contacto con el suelo. Es

frecuente encontrar numerosos machos en el interior de la matriz mucilaginosa (Doucet & Lax, 2005). Los huevos van a eclosionar cuando las condiciones del medio resulten favorables, pudiendo permanecer viables dentro de la masa durante varios meses (González & Franco, 1997).

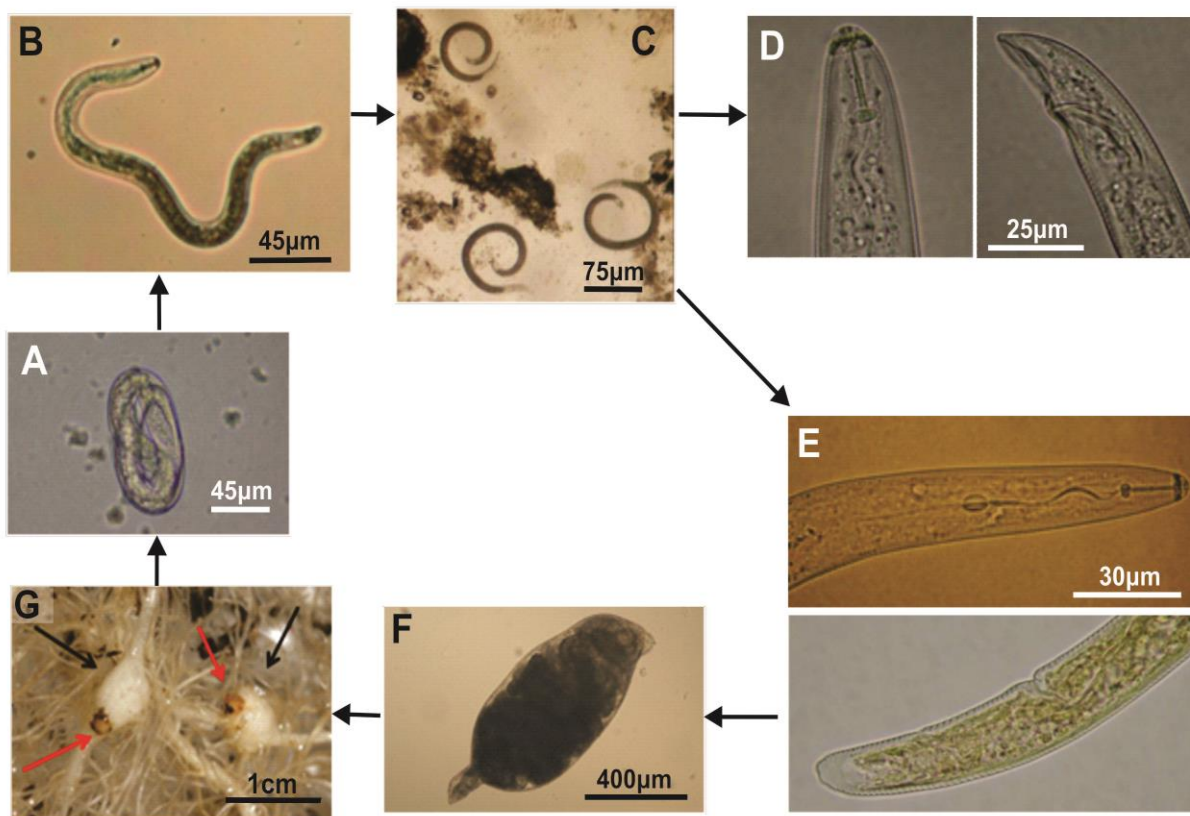


Figura 1. Esquema del ciclo de vida de *Nacobbus aberrans*. **A)** Huevo; **B)** Juvenil de segundo estadio; **C)** Juveniles de tercer y cuarto estadio; **D)** Macho: región anterior (izquierda) y posterior (derecha); **E)** Hembra inmadura: región anterior (arriba) y posterior (abajo); **F)** Hembra madura; **G)** Sistema radical de tomate con agallas (flechas negras) y masas de huevos (flechas rojas).

En Argentina, este nematodo se encuentra en las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Corrientes, Mendoza, Misiones, Río Negro, San Juan, San Luis, Santa Fe, Catamarca, Jujuy, Salta y Tucumán (Doucet & Lax, 2005). En Córdoba, representa una plaga importante en cultivos de tomate y pimiento que se desarrollan bajo cubierta; en algunas ocasiones, cuando la densidad de población de los nematodos en el suelo es muy elevada, las plantas parasitadas pueden presentar escaso crecimiento y signos de marchitamiento, pudiendo incluso ocasionarles la muerte (Lax *et al.*, 2011a).

Control biológico

El manejo de los nematodos fitófagos en los actuales sistemas de producción se basa, principalmente, en el uso de plantas resistentes, la aplicación de nematicidas y la rotación de cultivos (Timper, 2011). Debido al impacto negativo que ocasionan los agroquímicos sobre la salud humana y el ambiente, se ha incrementado la búsqueda de alternativas de manejo de plagas (Hallmann *et al.*, 2009). El control biológico es considerado una estrategia para el reemplazo de los pesticidas (Khan & Haque, 2011). Tiene la ventaja de ser económico y ambientalmente seguro; no genera efectos residuales tóxicos y no es nocivo para los enemigos naturales y para el ser humano (Guédez *et al.*, 2008).

Entre los microorganismos antagonistas naturales de nematodos fitófagos, se destacan rizobacterias promotoras del crecimiento, especialmente los géneros *Bacillus*, *Rhizobium*, *Pseudomonas* y *Serratia* (Maheshwari *et al.*, 2013). Este último género incluye especies presentes en agua, suelo, plantas, insectos, pequeños mamíferos y pacientes hospitalizados (Grimont & Grimont, 2006). Incluso, algunas especies de *Serratia* muestran distintos tipos de asociación con nematodos entomopatógenos: a) simbiosis: *Serratia nematodiphila* en *Heterorhabditoides chongmingensis*, responsable de la muerte del insecto que parasita (Zhang *et al.*, 2009); b) forosis: *Serratia marcescens* puede hallarse en la cutícula de juveniles infectivos de aislados de *Steinernema* spp. multiplicados en laboratorio (Gouge & Snyder, 2006; Ortega-Estrada *et al.*, 2012).

Entre las especies del género, se destaca *S. marcescens* por su habilidad de inducir resistencia sistémica en plantas frente a varios patógenos del suelo (El Khaldi *et al.*, 2015).

Además, tiene potencial insecticida (Sikorowski *et al.*, 2001; Tambong, 2013) y nematocida, principalmente con especies de *Meloidogyne*, otro género formador de agallas (Zavaleta-Mejía & Van Gundy, 1989a; Zeinat *et al.*, 2009; 2010; Zaghoul *et al.*, 2015). Experiencias *in vitro* realizadas hace más de dos décadas, evidenciaron que *S. marcescens* sobre agar nutritivo produjo amoníaco; este metabolito volátil ocasionó la mortalidad del 95-100% de J2 de *Meloidogyne incognita* (Zavaleta-Mejía & Van Gundy, 1989b). Además, en placas con medio de cultivo cerebro-corazón, la bacteria causó la muerte del 99% de J2 de esa misma especie de nematodo fitófago (Zaghoul *et al.*, 2015). Por otro lado, bajo condiciones de invernadero, la aplicación de *S. marcescens* en plantas de haba (*Vicia faba*) parasitadas con *M. incognita* disminuyó un 74-90% el número de agallas y un 77-84% la población final del nematodo; al mismo tiempo, la inoculación de la bacteria incrementó la cantidad de vainas así como el peso seco de la parte aérea y de las raíces (Zeinat *et al.*, 2009; 2010). Según esos autores, el aumento de la biomasa podría ser resultado de metabolitos producidos por *S. marcescens* que actuarían como promotores del crecimiento o serían tóxicos para los nematodos.

Algunas especies de *Serratia* producen un pigmento rojo llamado prodigiosina (Grimont & Grimont, 2006). Este metabolito secundario tiene un gran potencial biotecnológico (Darshan & Manonmani, 2015). Es utilizado como reemplazo de colorantes sintéticos en la industria alimenticia (Namazkar & Ahmad, 2013) así como en la tinción de telas, papeles, jabones y tintas (Venil *et al.*, 2013). Por otra parte, inhibe bacterias gram-positivas, posee actividad antifúngica (Chandni *et al.*, 2012), antiprotozoaria (Genes *et al.*, 2011) y anticancerígena (Maheswarappa *et al.*, 2013). Además, ha demostrado tener acción insecticida sobre estadios larvales y pupales de mosquitos, *Aedes aegypti* y *Anopheles stephensi* (Chandrashekhar *et al.*, 2011; Suryawanshi *et al.*, 2015). Hasta el momento, sólo un estudio mostró en condiciones *in vitro* un efecto nematocida en juveniles de *Meloidogyne javanica* y *Radopholus similis* e inhibición en la eclosión de los huevos (Suryawanshi *et al.*, 2014).

Recientemente, en el Laboratorio de Nematología (IDEA CONICET-UNC) y el Laboratorio del Centro de Excelencia en Procesos y Productos de Córdoba (CEPROCOR) se extrajo una cepa de *Serratia* sp. de la cutícula de juveniles infectivos de un aislado de nematodo entomopatógeno del género *Steinernema*; esa cepa es capaz de generar

prodigiosina. Debido al escaso conocimiento de los efectos de este metabolito como posible agente de control biológico de nematodos fitófagos y la importancia de la especie *N. aberrans* para la agricultura en nuestro país, se desarrolló el presente trabajo.

HIPÓTESIS

- La prodigiosina tiene efecto nematocida sobre los J2 de *N. aberrans*; su aplicación en suelo disminuye la penetración del nematodo en plantas de tomate.

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la efectividad del metabolito secundario de la cepa de *Serratia* sp. como una alternativa para el control biológico de poblaciones de *N. aberrans*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar en experiencias *in vitro*, la dosis letal 50 (DL₅₀) y 90 (DL₉₀) de prodigiosina obtenida a partir de un aislado de *Serratia* sp. sobre J2 de *N. aberrans*.
- Evaluar el efecto del pigmento sobre la penetración de J2 de *N. aberrans* en raíces de tomate.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del inóculo de *N. aberrans*

Para las experiencias *in vitro*, se consideraron dos poblaciones provenientes de las localidades de Santa María (departamento Santa María, provincia de Catamarca) y Río Cuarto (departamento Río Cuarto, provincia de Córdoba). En lotes contaminados de ambas localidades se tomaron muestras de suelo, así como de raíces de tomate y pimiento que fueron transportadas al Laboratorio de Nematología. Las raíces infectadas se lavaron con agua corriente y, bajo microscopio estereoscópico, se extrajeron masas de huevos que se colocaron en cápsulas de Petri con agua destilada. Se mantuvieron a temperatura ambiente ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) hasta la eclosión de los huevos (Figura 2).

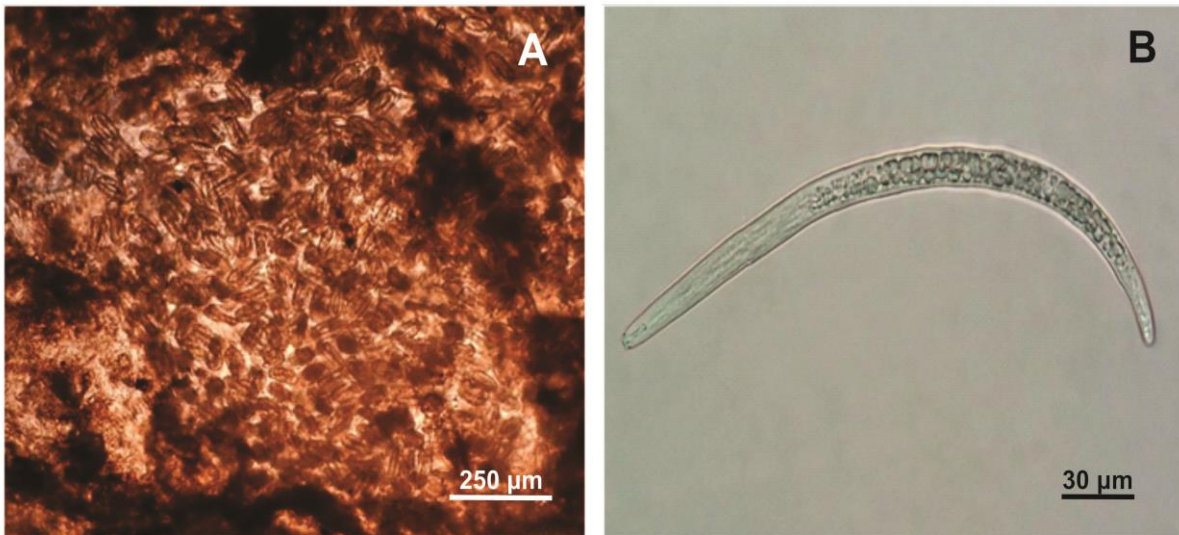


Figura 2. Obtención del inóculo de *Nacobbus aberrans*. **A)** Masa de huevos extraída de raíces de tomate de Río Cuarto; **B)** Juvenil de segundo estadio.

Obtención de la prodigiosina

En el laboratorio de Biología Molecular (CEPROCOR Punilla) se dispone de una cepa de *Serratia* sp. que fue aislada recientemente de juveniles infectivos de *Steinernema* sp. (localidad Marcelino Escalada, departamento San Justo, Santa Fe). En base a estudios previos de ADN del gen 16S, la bacteria muestra un elevado porcentaje de similitud con *S. marcescens* (datos no publicados); actualmente, se está analizando otro gen a fin de confirmar su identidad.

La obtención de prodigiosina se realizó según la metodología descrita por Montaner y Pérez-Tomás (2001) con modificaciones que se detallan a continuación. Las bacterias se multiplicaron en medio líquido cerebro-corazón (37 g/l) que se incubó a 25°C durante 48 h. El cultivo fue centrifugado a 6.800 g durante 15 min (Centrífuga Beckman J2-MI) para separar las bacterias (sedimento) y el sobrenadante. El sedimento se procesó para la obtención del pigmento purificado; la extracción se realizó colocando 4 g de bacteria con 200-250 ml de metanol acidificado (4% de 1M HCL en 96 ml de metanol) (Goldschmidt & Williams, 1968). Luego, se centrifugó durante 5 min a 6.800 g; esta operación se repitió 2 veces para recuperar la máxima cantidad de pigmento. El metanol se eliminó mediante evaporación en un Rota vapor Bucchi R-215 a 40°C. La prodigiosina obtenida se re-suspendió en buffer PSB 1x; posteriormente, se agregó 1,5 % de glicerol y se conservó a -20°C.

La cuantificación del metabolito se realizó a partir de una dilución 1:9 en buffer PSB. En un espectrofotómetro (Perkin Elmer uv/vis lambda 25) se midió la absorbancia a 534 nm (corresponde al pico de absorbancia del pigmento) y a 655 nm (factor de corrección). La concentración se estimó tomando como referencia que una diferencia de 1 unidad entre los dos valores obtenidos equivale a 19,3 µg/ml de prodigiosina (Goldschmidt & Williams, 1968).

Diseño experimental

- Evaluación *in vitro* del potencial nematocida de la prodigiosina

Al momento de realizar la experiencia con ambas poblaciones del nematodo, los J2 obtenidos de las masas de huevos fueron esterilizados externamente. Para ello, el contenido de las cápsulas de Petri se concentró en un tamiz de 5 μm y se transfirió a una nueva cápsula con una solución de 0,5% NaClO; después de 1 min, para eliminar restos de esa solución, los nematodos se enjuagaron 4 veces con agua destilada (Da Silva Sousa *et al.*, 2010). Se colocaron en cápsulas de Petri y, con la ayuda de una micropipeta, se recuperaron para la preparación del inóculo.

Se utilizaron placas de cultivo celular de 1,5 cm de diámetro; en cada una, se colocaron 200 μl de agua destilada con 50 J2 de *N. aberrans*. A continuación, se aplicó el mismo volumen de las diluciones de prodigiosina para obtener, en cada pocillo, las siguientes concentraciones: 3, 6, 9, 12, 24 y 36 $\mu\text{g/ml}$. Dado que el metabolito fue conservado en glicerol, el tratamiento control consistió en agua estéril a la que se le agregó glicerol hasta alcanzar la concentración en la que se hallaba presente en la dilución más alta de prodigiosina. Las placas se mantuvieron a $24\pm 1^\circ\text{C}$ en la oscuridad. Se efectuaron 4 réplicas por tratamiento y el experimento completo se repitió tres veces. A las 24 y 48 h, se cuantificó la mortalidad de los J2; el nematodo se consideró muerto cuando su cuerpo se observó estirado y no se movió al ser tocado con una aguja delgada (Cayrol *et al.*, 1989). Al finalizar cada experiencia, fueron transferidos a placas conteniendo agua destilada en donde permanecieron durante 24 h para evaluar si recuperaban su movilidad (Ashoub & Amara, 2010). Los datos obtenidos se utilizaron para el cálculo de la DL_{50} y DL_{90} de ambas poblaciones.

- Efecto de la prodigiosina en la penetración de J2 de *N. aberrans* en plantas de tomate

Esta experiencia se desarrolló con la población de *N. aberrans* proveniente de la localidad de Río Cuarto. Se pusieron a germinar semillas de tomate cv Platense en bandejas

plásticas con tierra estéril y vermiculita (2:1). Se seleccionaron 24 plántulas con 4 hojas verdaderas que fueron sometidas a los siguientes tratamientos (cada uno con 8 réplicas):

- 1) J2 de *N. aberrans* (control);
- 2) J2 de *N. aberrans* + DL₅₀ de prodigiosina;
- 3) J2 de *N. aberrans* + DL₉₀ de prodigiosina.

Los tomates fueron trasplantados individualmente (Figura 3) en recipientes de plástico (20 cm de longitud x 4 cm de ancho, con una capacidad de 190 g de sustrato), representado por una mezcla de tierra y arena esterilizadas (3:1) con autoclave. En cada maceta se colocaron dos tercios del sustrato y con ayuda de una varilla de vidrio se introdujo cuidadosamente la plántula. Sobre las raíces, se inocularon los nematodos (200 J2/1,5 ml de agua); luego el sistema radical fue recubierto con la misma mezcla. Inmediatamente, en los tratamientos con prodigiosina se aplicaron 4 ml de las DL₅₀ y DL₉₀ sobre la superficie del sustrato de cada recipiente; en el caso del control, se administró el mismo volumen de agua. El diseño del experimento fue completamente aleatorizado. Las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero a 24±1°C y se regaron cada 48 h; el foto-período fue de 12 h. Transcurridos 12 días después de la inoculación, las plantas se desenterraron cuidadosamente y se lavaron las raíces con agua corriente para remover las partículas de sustrato adheridas. Inmediatamente, los sistemas radicales de todas las plantas fueron procesados mediante la técnica de fucsina-ácida (Bybd *et al.*, 1983). Las raíces fueron cortadas en segmentos de 1-2 cm de longitud; se las colocó en un vaso de precipitado con 50 ml de agua corriente y 20 ml de 5,25% NaClO, dejándolas 4 min con agitación suave. A continuación fueron lavadas durante 15 min para eliminar los restos de NaClO; se las transfirió a una solución con 30 ml de agua y 1 ml de fucsina-ácida. El material fue calentado y, una vez alcanzado el punto de ebullición, se mantuvo durante 30 seg; se dejó enfriar y se lavó con abundante agua. Posteriormente, las raíces fueron sumergidas en 20-30 ml de glicerina acidificada y se calentaron hasta el punto de ebullición. Una vez frías, se transfirieron a un recipiente con 50 ml de agua y fueron licuadas 3 veces durante 10 seg (Speijer & De Waele, 1997); el macerado fue concentrado en un volumen final de 10 ml. Para contabilizar la cantidad de nematodos que penetraron en las raíces de cada planta, la solución se homogeneizó y se tomaron 3 alícuotas (con

reposición) de 1 ml (Coyne *et al.*, 2007) que fueron contabilizadas en una cámara de recuento bajo microscopio óptico.



Figura 3. Plantas de tomate inoculadas con *Nacobbus aberrans* y tratadas con prodigiosina.

Análisis de datos

Los datos correspondientes a la mortalidad de los J2 fueron corregidos de acuerdo a la fórmula de Schneider-Orelli: % mortalidad corregida = $100 \times [(\% \text{ mortalidad por tratamiento} - \% \text{ mortalidad en el control}) / (100 - \% \text{ mortalidad en el control})]$ (Cheng *et al.*, 2015). De esta manera, sólo se consideró el efecto del tratamiento sobre los J2, eliminando la muerte natural observada en el control (Ntalli *et al.*, 2011). Con los datos de

mortalidad, se estimó para ambas poblaciones la DL_{50} y DL_{90} de acuerdo a la fórmula descrita por Alexander *et al.* (1998).

Mediante un Modelo Lineal Generalizado Mixto (MLGM), se analizó el efecto a las 24 y 48 h de las distintas dosis de prodigiosina evaluadas sobre la mortalidad de los J2; para la variable respuesta se especificó una distribución binomial (función logit) y se definieron los efectos fijos (tratamientos, tiempo y poblaciones) y aleatorio (repeticiones). La variable “número de juveniles en raíces” también se analizó mediante un MLGM; se modeló estableciendo una distribución de Poisson (función logaritmo) para la variable respuesta, los tratamientos como efecto fijo y las alícuotas por planta como efecto aleatorio. En los dos modelos para la comparación de medias entre tratamientos, se realizó un test a posterior DCG ($p \leq 0,05$). Para los análisis se empleó el programa estadístico Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2013).

En el caso de la experiencia sobre tomate, se estimó la reducción en la cantidad de juveniles que ingresaron en las raíces de las plantas tratadas con prodigiosina con respecto al control; para ello, se modificó la fórmula indicada por Hol y Cook (2005) de la siguiente manera: respuesta al tratamiento = [(juveniles que penetraron en el control - juveniles que penetraron en el tratamiento) / juveniles que penetraron en el control] x 100.

RESULTADOS

- Evaluación *in vitro* del potencial nematocida de la prodigiosina

Finalizada la exposición a las diferentes dosis de prodigiosina, los J2 de *N. aberrans* no recuperaron la movilidad cuando fueron transferidos al agua destilada durante 24 h. El porcentaje de mortalidad de los nematodos de Río Cuarto y Santa María aumentó en función del tiempo y la concentración del metabolito (Figura 4 A, B). En ambas poblaciones, se observaron diferencias significativas en la mortalidad obtenida entre las distintas concentraciones de prodigiosina con respecto al control; esto ocurrió en los dos tiempos considerados ($p=0,0001$ en ambos momentos). El 100% de muertes se alcanzó a la mayor dosis (36 $\mu\text{g/ml}$) a las 24 h y 48 h en el caso de Río Cuarto y Santa María, respectivamente.

Al comparar la respuesta entre poblaciones para una misma dosis, a las 24 h se detectaron diferencias a los valores de 12, 24 y 36 $\mu\text{g/ml}$ ($p=0,0003$) (Figura 4 A) mientras que a las 48 h no hubo diferencias entre poblaciones para una misma concentración ($p=0,5517$). Los valores de la DL_{50} y DL_{90} se indican en la Tabla 1.

Tabla 1. Valores obtenidos de la DL_{50} y DL_{90} a las 48 h para poblaciones de *Nacobbus aberrans* provenientes de Río Cuarto (Córdoba) y Santa María (Catamarca).

| Dosis | Río Cuarto | Santa María |
|-----------|-----------------------|-----------------------|
| DL_{50} | 12,4 $\mu\text{g/ml}$ | 13,2 $\mu\text{g/ml}$ |
| DL_{90} | 24,9 $\mu\text{g/ml}$ | 24,9 $\mu\text{g/ml}$ |

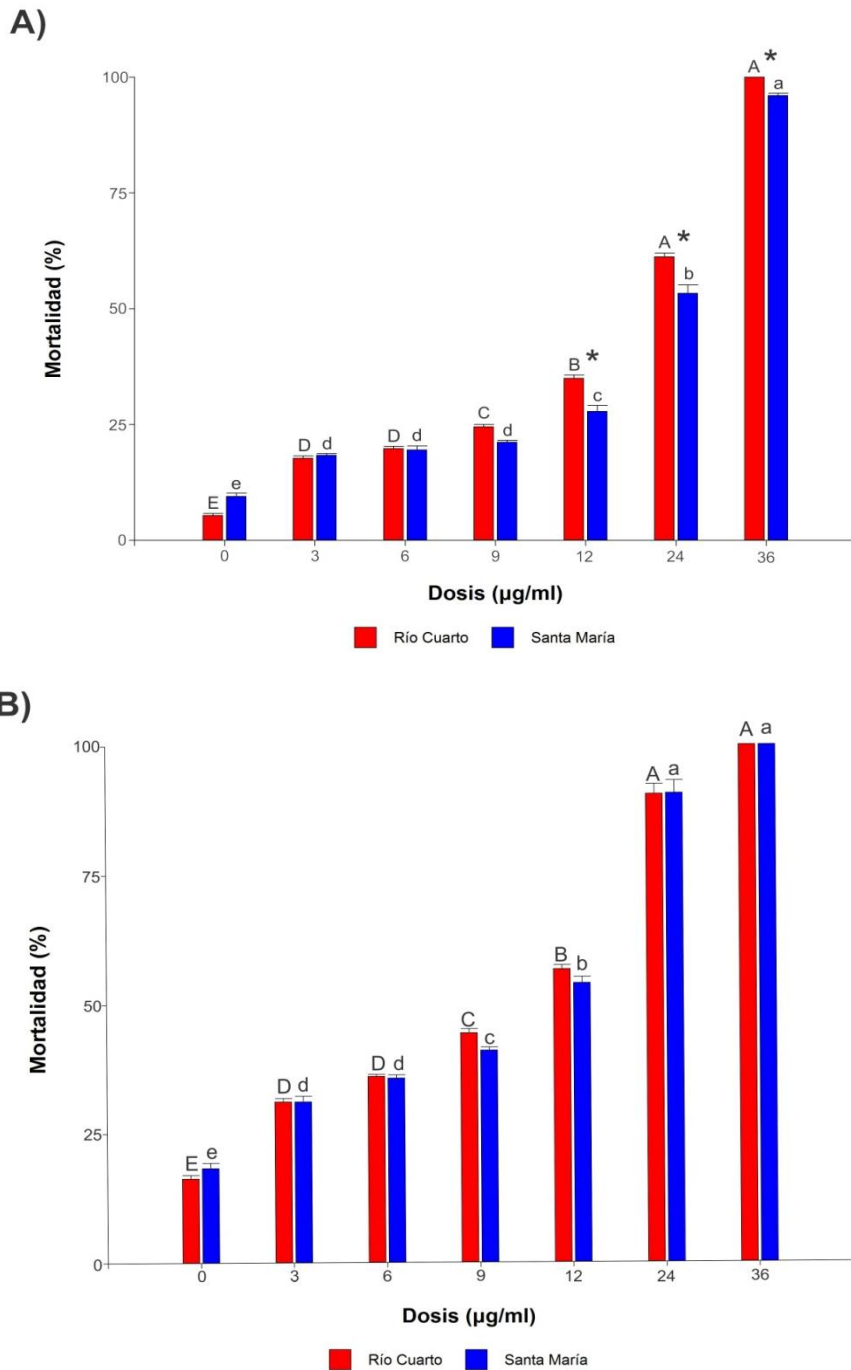


Figura 4. Porcentaje de mortalidad de J2 de *Nacobbus aberrans* luego de la aplicación de distintas dosis de prodigiosina obtenida de *Serratia* sp. **A)** 24 h; **B)** 48 h. Letras minúsculas/mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos para una misma población, según test de DCG ($p \leq 0,05$). Los asteriscos representan diferencias significativas entre poblaciones para un mismo tratamiento. Las barras indican error estándar de la media.

- Efecto de la prodigiosina en la penetración de J2 de *N. aberrans* en plantas de tomate

Las raíces de tomate, tanto en el control como en los dos tratamientos con prodigiosina, fueron parasitadas por los juveniles de *N. aberrans*; esto se evidenció después de procesar los sistemas radicales con la técnica de fucsina-ácida (Figura 5).

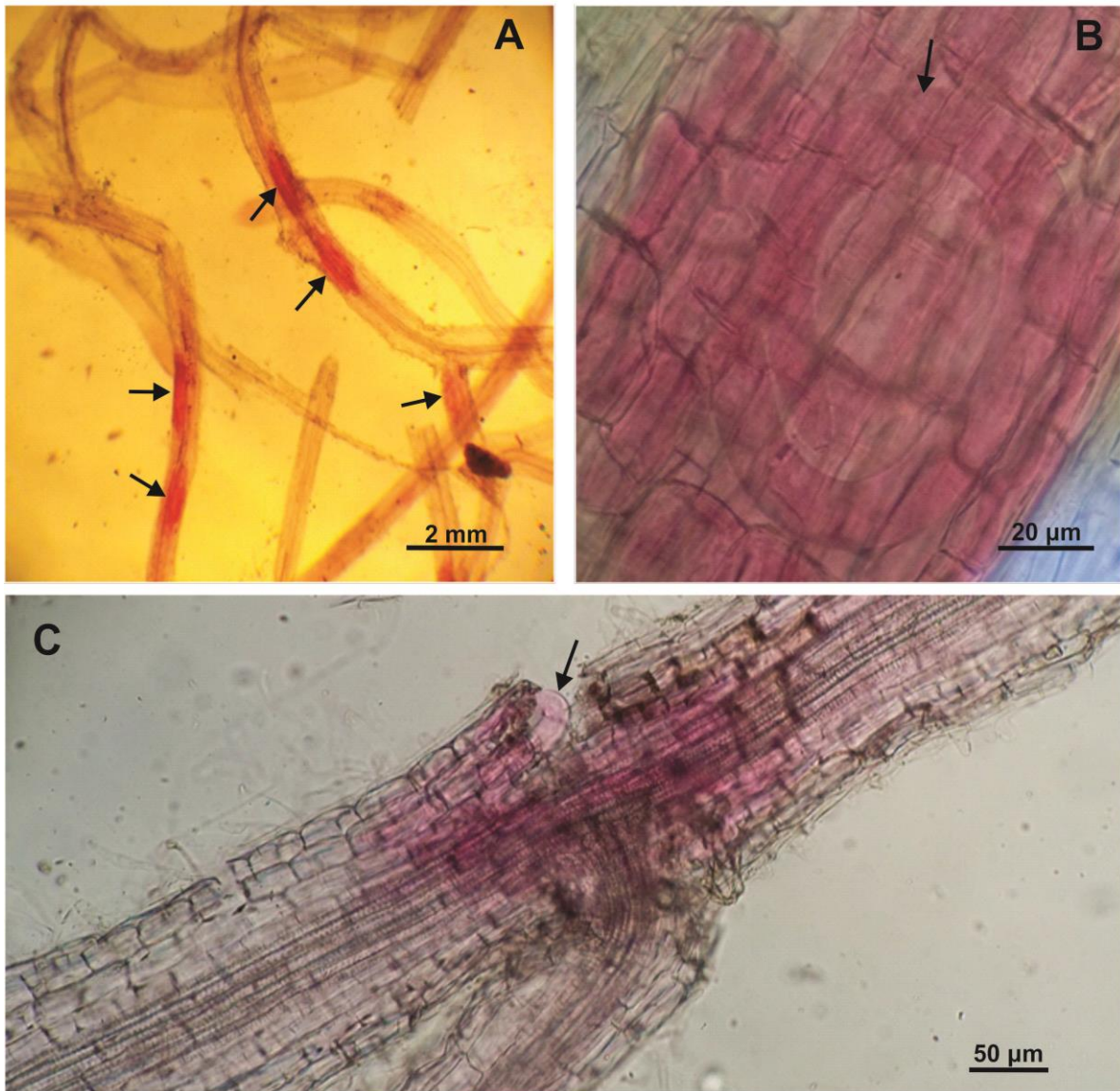


Figura 5. Raíces de tomate parasitadas por *Nacobbus aberrans* y procesadas con fucsina-ácida. **A)** Zonas teñidas que indican la presencia de los nematodos (flechas). **B, C)** Detalle del juvenil dentro de los tejidos (flecha).

A los 12 días después de la inoculación, el número de juveniles que ingresó en las raíces de las plantas tratadas fue significativamente menor con respecto al control ($p=0,0001$) (Figura 6). Con respecto a la “respuesta al tratamiento”, la penetración de los nematodos mostró diferencias entre la DL_{50} (12,4 $\mu\text{g/ml}$) y DL_{90} (24,9 $\mu\text{g/ml}$), disminuyendo en un 59% y 83% al incrementarse la dosis de prodigiosina.

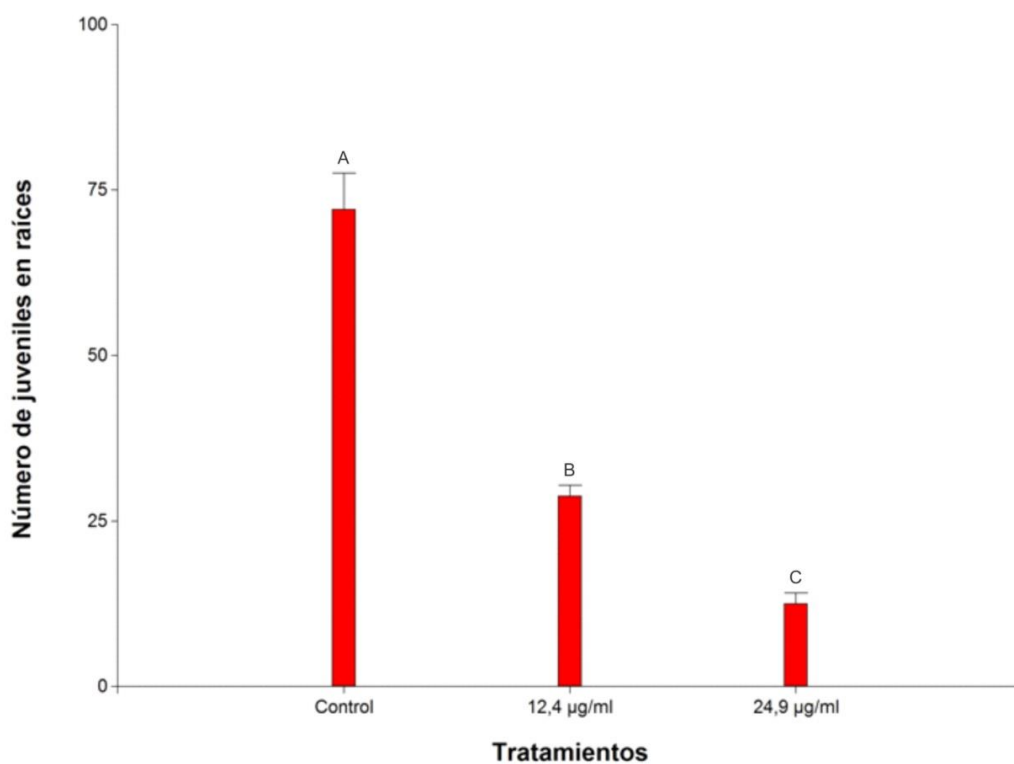


Figura 6. Número de juveniles de *Nacobbus aberrans* en raíces de tomate a los 12 días después de la inoculación y la aplicación de prodigiosina a dos concentraciones (12,4 $\mu\text{g/ml}$ y 24,9 $\mu\text{g/ml}$). Letras distintas indican diferencias significativas según el test de DCG ($p\leq 0,05$). Los datos representan una media de ocho réplicas. Las barras indican error estándar de la media.

DISCUSIÓN

Los escasos estudios realizados hasta el momento, han mostrado el antagonismo de *Serratia* spp. frente a poblaciones de nematodos parásitos de plantas, tanto *in vitro* (Zavaleta-Mejía & Van Gundy, 1989a; El-Sherif *et al.*, 1999; Zaghloul *et al.*, 2015) como en invernadero (Noweer & Hasabo, 2005; Zeinat *et al.*, 2009; Abd-Elgawad & Kabeil, 2010). Si bien el efecto antagónico de la prodigiosina sobre diferentes organismos se conoce desde hace varias décadas, poco se sabe sobre su potencial para el control de nematodos fitófagos.

En el presente trabajo, por primera vez se pone en evidencia la acción nematocida de la prodigiosina sobre J2 de *N. aberrans*. Las experiencias realizadas *in vitro* mostraron que este metabolito ocasionó la muerte de los nematodos a medida que se incrementó la concentración y el tiempo de exposición, obteniendo el 100% de mortalidad en las dos poblaciones consideradas. Este pigmento también resultó ser altamente tóxico para juveniles de otras dos especies de nematodos fitófagos (Suryawanshi *et al.*, 2014); si bien, en ese estudio se obtuvo el 100% de mortalidad a las 24 h (*M. javanica*) y 36 h (*R. similis*), las concentraciones a las que se alcanzó ese valor fueron superiores (250-500 µg/ml y 500 µg/ml, respectivamente).

Suryawanshi *et al.* (2015) evaluaron el efecto insecticida del extracto purificado de prodigiosina, obteniendo dosis letales a menores concentraciones que al utilizar extractos crudos (Chandrashekar *et al.*, 2011). Eso podría deberse a que el producto sin purificar puede contener, además, otros metabolitos generados por la bacteria, interfiriendo en la actividad insecticida del pigmento (Suryawanshi *et al.*, 2015). En el presente trabajo, las concentraciones de la DL₅₀ (12,4-13,2 µg/ml) y DL₉₀ (24,9 µg/ml) fueron aproximadamente entre 6 (DL₅₀) a 11 (DL₉₀) veces más bajas que las obtenidas previamente para *M. javanica* (DL₅₀=79 µg/ml; DL₉₀=182 µg/ml) y *R. similis* (DL₅₀=83 µg/ml; DL₉₀=272 µg/ml) (Suryawanshi *et al.*, 2014). Es importante señalar que, si bien en ambas experiencias se utilizó el pigmento purificado, la diferencia en las dosis letales podría deberse al empleo de distintas cepas bacterianas o a una mayor susceptibilidad de *N. aberrans*. Suryawanshi *et al.* (2014) señalaron que sus concentraciones de DL₅₀ oscilaron entre 5 a 10 veces por debajo de las dosis que comúnmente se utilizan en pesticidas; si se tienen en cuenta los

resultados del presente trabajo, los valores que se obtuvieron para *N. aberrans* serían aún más bajos.

El efecto antagónico observado en condiciones *in vitro*, se corroboró con la experiencia con plantas de tomate. En invernadero, se detectaron diferencias significativas en el número de juveniles que penetraron en las raíces tratadas con respecto al control. La aplicación de prodigiosina en suelo redujo el ingreso de los J2 de *N. aberrans* en los tejidos radicales del hospedador en un 59% y 83% al suministrar una dosis de 12,4 y 24,9 µg/ml, respectivamente. Es probable que, tal como se demostró *in vitro*, el metabolito haya ocasionado la muerte de los nematodos en el suelo. Zeinat *et al.* (2009) mostraron que al tratar el suelo con rizobacterias, *Pseudomonas protegens* (ex *Pseudomonas fluorescens*) y *S. marcescens*, se redujo la población final de *M. incognita* en haba. Una situación similar se puso en evidencia al aplicar *P. protegens* CHAO en plantas de tomate parasitadas por *N. aberrans* (Lax *et al.*, 2013). En esos trabajos se atribuyó que los resultados obtenidos podrían ser debido a que las bacterias y/o sus metabolitos extracelulares afectaron el ingreso de los J2 en las raíces del hospedador o causaron su muerte antes que pudieran penetrar en los tejidos.

En condiciones *in vitro*, las dos poblaciones de *N. aberrans* consideradas no mostraron diferencias en la mortalidad a las 48 h. Es importante señalar que dentro de la especie existen razas fisiológicas/grupos/patotipos; la raza a la que pertenece una población puede ser definidas de acuerdo a la capacidad/incapacidad de parasitar determinadas plantas (denominadas hospedadores diferenciales) (Lax *et al.*, 2011b). Dado que los nematodos provenientes de distintas áreas geográficas pueden presentar diferencias en su comportamiento, sería de utilidad realizar estudios similares con otras poblaciones del parásito.

El uso del metabolito secundario evaluado podría ser más efectivo que la aplicación de la bacteria para el manejo de nematodos fitófagos; a esto se le suma que, incluso a altas dosis (500 µg/ml), no mostró toxicidad contra microorganismos benéficos para la agricultura, tales como *Bradyrhizobium japonicum*, *Azotobacter vinelandii* y *Trichoderma viride* (Suryawanshi *et al.*, 2014). El pigmento producido por la cepa de *Serratia* sp. (aislada de *Steinernema* sp.) podría representar un método alternativo de control biológico de poblaciones de *N. aberrans*. Los resultados obtenidos evidenciaron el efecto antagónico

de la prodigiosina sobre el nematodo tanto *in vitro* así como cuando fue aplicado al suelo. Sería de interés identificar a nivel específico la bacteria y seguir investigando las potencialidades del empleo del pigmento, incorporando otras cepas bacterianas para seleccionar aquellas más patógenas, así como realizar estudios a mayor escala, tanto en invernadero como a campo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abd-Elgawad M. M. M. & Kabeil S. S. A., 2010. Management of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on tomato in Egypt. *Journal of American Science* 8: 256-262.
- Alexander B.; Browse D. J.; Reading S. J. & Benjamin I. S., 1998. A simple and accurate mathematical method for calculation of the EC₅₀. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 41: 55-58.
- Ashoub A. H. & Amara M. T., 2010. Biocontrol activity of some bacterial genera against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Journal of American Science* 6: 321-328.
- Bybd D. W.; Kirkpatrick T. & Barker K. R., 1983. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. *Journal of Nematology* 15: 142-143.
- CABI & EPPO, 1997. Quarantine pests for Europe. 2da Edición. CAB International, Wallingford, UK. 1425 pp.
- Cayrol J. C.; Djian C. & Pijarowski L., 1989. Study on the nematocidal properties of the culture filtrate of the nematophagous fungus *Paecilomyces lilacinus*. *Revue de Nématologie* 12: 331-336.
- Chandni G.; Sourav B. & Arijit D., 2012. Assessment of process parameters influencing the enhanced production of prodigiosin from *Serratia marcescens* and evaluation of its antimicrobial, antioxidant and dyeing potentials. *Malaysian Journal Microbiology* 18: 116-122.
- Chandrashekar D. P.; Satish V. P.; Bipinchandra K. S. & Rahul B. S., 2011. Prodigiosin produced by *Serratia marcescens* NMCC46 as a mosquito larvicidal agent against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. *Parasitology Research* 109: 1179-1187.
- Cheng X.; Liu X.; Wang H.; Ji X.; Wang K.; Wei M. & Qiao K., 2015. Effect of emamectin benzoate on root-knot nematodes and tomato yield. *Plos One* 10: 1-10.
- Costilla M. & Ojeda S., 1985. Grado de susceptibilidad y resistencia de plantas cultivadas y no cultivadas al falso nematodo del nudo *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935), Thorne & Allen, 1944 en Argentina. En: *Investigaciones Nematológicas en Programas Latinoamericanos de Papa* vol. 1. Eds. Franco J. & Rincón H. International Potato Center, Lima, Perú: 21-25.

- Coyne D. L.; Nicol J. M. & Claudius-Cole B., 2007. *Nematologia práctica: um guia de campo e de laboratório*. SP-IPM Secretariat, International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Cotonou, Benin. 82 pp.
- Da Silva Sousa C.; Fermino Soares A. C.; Coimbra J. L.; Da Silva Garrido M. & Da Silva Machado G., 2010. Fungos micorrízicos arbusculares no controle de *Meloidogyne incognita* em mudas de tomateiro. *Revista Caatinga* 23: 15-20.
- Darshan N. & Manonmani H. K., 2015. Prodigiosin and its potential applications. *Journal of Food Science and Technology* 52: 5393-5407.
- Di Rienzo J. A.; Casanoves F.; Balzarini M. G.; Gonzalez L.; Tablada M. & Robledo C. W., 2013. InfoStat versión 2013. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Doucet M. E. & Lax P., 2005. El género *Nacobbus* Thorne & Allen, 1944 en Argentina. 6. La especie *N. aberrans* (Thorne, 1935) Thorne & Allen, 1944 (Nematoda: Tylenchida) y su relación con la agricultura. *Anales de la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria* 59: 5-45.
- El Khaldi R.; Remadi M. D.; Hamada W.; Somai L.; Cherif M., 2015. The potential of *Serratia marcescens*: an indigenous strain isolated from date palm compost as biocontrol agent of *Rhizoctonia solani* on potato. *Journal of Plant Pathology & Microbiology* S3: doi.org/10.4172/2157-7471.S3-006.
- El-Sherif M. A.; Ali A. H. & Barakat M. I. C., 1999. Suppressive bacteria associated with plant parasitic nematodes in Egyptian agriculture. *Japanese Journal of Nematology* 24: 55-59.
- EPPO, 2011. PQR-EPPO Database on Quarantine Pests. Disponible: <http://www.eppo.int>.
- Genes C.; Baquero E.; Echeverri F.; Maya J. D. & Triana O., 2011. Mitochondrial dysfunction in *Trypanosoma cruzi*: the role of *Serratia marcescens* prodigiosin in the alternative treatment of Chagas disease. *Parasites Vectors* 4: 66-70.
- Goldschmidt M. C. & Williams R. P., 1968. Thiamine-induced formation of the monopyrrole moiety of prodigiosin. *Journal of Bacteriology* 96: 609-616.
- González A. & Franco J., 1997. Los nematodos en la producción de semilla de papa. En *Producción de tubérculos- semilla de papa: Manual de capacitación*. Centro Integral de la Papa (CIP) 3: 1-13.

- Gouge D. H. & Snyder J. L., 2006. Temporal association of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) and bacteria. *Journal of Invertebrate Pathology* 91: 147-157.
- Grimont F. & Grimont P. A. D., 2006. The Genus *Serratia*. En: *Prokaryotes*. Eds. Dworkin M., Falkow S.; Rosenberg E.; Schleifer K. H. & Stackebrandt E. 3ra Edición. Springer-Verlag, New York, E. U. A.: 219-244.
- Guédez C.; Castillo C.; Cañizalez L. & Olivar R., 2008. Control biológico: una herramienta para el desarrollo sustentable y sostenible. *Academia* 13: 50-74.
- Hol H. W. G. & Cook R., 2005. An overview of arbuscular mycorrhizal fungi-nematode interactions. *Basic and Applied Ecology* 6: 489-503.
- Hallmann J.; Davies K. G. & Sikora R. A., 2009. Biological control using microbial pathogens, endophytes and antagonists. En: *Root-knot nematodes*. Eds. Perry R. N.; Moens M. & Starr J. L. CAB International, Wallingford, UK: 380-411.
- Inserra R. N., Vovlas N., Griffin G. D. & Anderson J. L., 1983. Development of the false root-knot nematode, *Nacobbus aberrans*, on sugarbeet. *Journal of Nematology* 15: 288-296.
- Khan M. R. & Haque Z., 2011. Soil application of *Pseudomonas fluorescens* and *Trichoderma harzianum* reduces root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, on tobacco. *Phytopathologia Mediterranea* 50: 257-266.
- Lax P.; Becerra A.; Soteras F.; Cabello M. & Doucet M. E., 2011a. Effect of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* on the false root-knot nematode *Nacobbus aberrans* in tomato plants. *Biology and Fertility of Soils* 47: 591-597.
- Lax P.; Rondan Dueñas J. C.; Coronel N. B.; Gardenal C. N.; Bima P. & Doucet M. E., 2011b. Host range study of Argentine *Nacobbus aberrans sensu* Sher populations and comments on the differential host test. *Crop Protection* 30: 1414-1420.
- Lax P.; Marro N.; Agaras B.; Valverde C.; Doucet M. E. & Becerra A., 2013. Biological control of the false root-knot nematode *Nacobbus aberrans* by *Pseudomonas protegens* under controlled conditions. *Crop Protection* 52: 97-102.
- Maheshwari D. K.; Shukla S.; Aeron A.; Kumar T.; Jha C. K.; Patel D.; Saraf M. & Wahla V., 2013. Rhizobacteria for management of nematode disease in plants. En: *Bacteria in*

- Agrobiología: Disease Management*. Ed. Maheshwari D. K. Springer-Verlag, Berlin, Alemania: 379-404.
- Maheswarappa G.; Kavitha D.; Vijayarani K. & Kumanan K., 2013. Prodigiosin as anticancer drug produced from bacteria of termite gut. *Indian Journal of Basic and Applied Medical Research* 3: 257-266.
- Manzanilla- López R. H.; Costilla M. A.; Doucet M. E.; Franco J.; Inserra R. N.; Lehman P. S.; Cid del Prado-Vera I.; Souza R. M. & Evans K., 2002. The genus *Nacobbus* Thorne & Allen, 1944 (Nematoda: Pratylenchidae): systematics, distribution, biology and management. *Nematropica* 32: 149-227.
- Manzanilla-López R.H.; Quénehérvé P.; Brito J. A.; Giblin-Davis R.; Franco J.; Román J. & Inserra R. N., 2008. Contributions by Latin American nematologists to the study of nematode plant disorders and related impact on crop production. En: *An Anecdotal History of Nematology*. Eds. Webster J. M., Eriksson J. M. & McNamara K. B. Pensoft, Sofia-Moscú: 191-218.
- Montaner B. & Pérez-Tomás R., 2001. Prodigiosin-induced apoptosis in human colon cancer cells. *Life Sciences* 68: 2015-1036.
- Namazkar S. & Ahmad W. A., 2013. Spray-dried prodigiosin from *Serratia marcescens* as a colorant. *Biosciences Biotechnology Research Asia* 10: 69-76.
- Noweer E. M. A. & Hasabo S. A. A., 2005. Effect of different management practices for controlling the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on squash. *Egyptian Journal of Phytopathology* 33: 73-81.
- Ntalli G. N.; Ferrari F.; Giannakouc I. & Menkissoglu-Spiroudia U., 2011. Synergistic and antagonistic interactions of terpenes against *Meloidogyne incognita* and the nematicidal activity of essential oils from seven plants indigenous to Greece. *Pest Management Science* 67: 341-351.
- Ortega-Estrada M. C.; Basurto-Ríos R.; Toledo J. & Ibarra J. E., 2012. Phoresis between *Serratia marcescens* and *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae) during infection of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *Florida Entomologist* 95: 120-127.
- Sikorowski P. P., Lawrence A. M. & Inglis G. D., 2001. Effects of *Serratia marcescens* on rearing tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae). *American Entomologist* 47: 51-60.

- Speijer, P. R.; De Waele D. D., 1997. Screening of *Musa* germplasm for resistance and tolerance to nematodes. *INIBAP Technical Guidelines*. 48 pp.
- Suryawanshi R. K.; Chandrashekhar P.; Hemanta B.; Chandrakant N.; Laxmikant S. & Patil S. V., 2014. Nematicidal activity of microbial pigment from *Serratia marcescens*. *Natural Product Research* 28: 1399-1404.
- Suryawanshi R. K.; Chandrashekhar D. P.; Borase H. P.; Chandrakant P. N.; Bipinchandra K. S. & Patil S. V., 2015. Mosquito larvicidal and pupaecidal potential of prodigiosin from *Serratia marcescens* and understanding its mechanism of action. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 123: 49-55.
- Tambong T. T., 2013. Phylogeny of bacteria isolated from *Rhabditis* sp. (Nematoda) and identification of novel entomopathogenic *Serratia marcescens* strains. *Current Microbiology* 66: 138-144.
- Timper P., 2011. Utilization of biological control for managing plant-parasitic nematodes. En: *Progress in Biological Control, Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes: Building Coherence between Microbial Ecology and Molecular Mechanisms*. Vol. 11. Eds. Davies K. & Spiegel Y. Springer, Países Bajos: 259-289.
- Venil C. K.; Zakaria Z. A. & Ahmad W. A., 2013. Bacterial pigments and their applications. *Process Biochemistry* 48: 1065-1079.
- Zaghloul R. A.; Neweigy N. A.; Abou-Aly H. E.; El-Sayed S. A. & Bahloul A. M., 2015. Nematicidal activity of some biocontrol agents against root-knot nematodes *in vitro*. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* 6: 429-438.
- Zhang C. X.; Yang S. Y.; Xu M. X.; Sun J.; Liu H.; Liu J. R.; Liu H.; Kan F.; Sun J.; Lai R. & Zhang K. Y., 2009. *Serratia nematodiphila* sp. nov., associated symbiotically with the entomopathogenic nematode *Heterorhabditidoides chongmingensis* (Rhabditida: Rhabditidae). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59: 1603-1608.
- Zavaleta-Mejía E. & Van Gundy S. D., 1989a. Effect of the bacterium *Serratia marcescens* Bizio on *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood. *Revista Mexicana de Fitopatología* 7: 178-187.

- Zavaleta-Mejía E. & Van Gundy S. D., 1989b. Volatile toxicity of *Serratia marcescens* Bizio and other bacteria on the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood. *Revista Mexicana de Fitopatología* 7: 188-194.
- Zeinat K. M.; El-Sayed S. A.; Radwan T. E. E. & Abd El-Wahab G. S., 2009. Potency evaluation of *Serratia marcescens* and *Pseudomonas fluorescens* as biocontrol agents for root-knot nematodes in Egypt. *Journal of American Science* 4: 93-102.
- Zeinat K. M.; Nagwa M. A.; El-Sayed S. A. & Abd El-Wahab G. S., 2010. Optimization of microbial biomass production as biocontrol agent against root-knot nematode on faba plants. *Journal of American Science* 6: 245-255.