



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

**“ACTIVIDAD NEMATICIDA DE *SERRATIA* SP. CONTRA EL NEMATODO
AGALLADOR *Nacobbus aberrans*”**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

IBT. Erick Williams Méndez Santiago

CO-DIRECTORES

Director: Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez

Codirectora: Dra. Liliana Aguilar Marcelino

CUERNAVACA, MORELOS

AGOSTO, 2020.

Resumen

El nematodo fitopatógeno *Nacobbus aberrans* afecta a diversos cultivos principalmente de Chile, papa, tomate y remolacha, además de ser considerado un nematodo de difícil manejo por sus ámbitos polífagos. El control convencional es mediante el uso de nematicidas químicos; sin embargo, el uso frecuente e indiscriminado de estos productos han generado un impacto negativo en la salud humana y al medio ambiente. Por tal motivo se ha incrementado la búsqueda de alternativas sustentables como el control biológico, el cual es considerado una estrategia para el reemplazo de los nematicidas químicos, ya que tiene la ventaja de ser económico y ambientalmente seguro, no genera efectos residuales tóxicos y tampoco es nocivo para los organismos benéficos y el ser humano. Inicialmente se identificó la cepa 15.2 mediante el gen *rpob*, el análisis de las secuencias mostró que pertenece al género *Serratia* y esta relacionada con las especies *S. marcescens* y *S. nematodiphila*, y que probablemente es una nueva subespecie de *Serratia*. Las rizobacterias del género *Serratia* han sido eficientes para reducir poblaciones de nematodos fitopatógenos, actualmente son mínimos los estudios que se han realizado en este género de la bacteria *Serratia*, con base en la información descrita, se evaluó *in vitro* e *in vivo* la actividad nematicida de la bacteria *Serratia* sp. contra *N. aberrans* (J₂). Finalmente, se evaluó *in vivo* la actividad nematicida de *Serratia* sp. contra *N. aberrans* en plantas de Chile (*Capsicum annuum*). Respecto al agallamiento, número de masas de huevos y huevos producidos por *N. aberrans* se encontraron diferencias significativas en cuanto a los tratamientos y el control (T1), y similares al T2 (nematicida químico) teniendo como mejor tratamiento el T6 a una concentración de 4×10^9 cel/mL reduciendo más del 50% de la población y el índice de reproducción, lo cual nos permite concluir que *Serratia* sp. es un buen candidato para controlar las poblaciones de nematodos agalladores como *N. aberrans* en plantas de Chile.

Palabras clave: Control biológico, nematodos agalladores, sustentabilidad, inocuidad.

Abstract

The phytopathogenic nematode *Nacobbus aberrans* affects several crops, mainly chili, potato, tomato and beet. It is also considered a difficult nematode to manage due to its polyphagous environment. Conventional control is through the use of chemical nematicides; however, the frequent and indiscriminate use of these products has generated a negative impact on human health and the environment. For this reason, the search for sustainable alternatives such as biological control has increased, which is considered a strategy for replacing chemical nematicides, since it has the advantage of being economical and environmentally safe, does not generate toxic residual effects and is not harmful to beneficial organisms and human beings. Strain 15.2 was initially identified by the *rpoB* gene, sequence analysis showed that it belongs to the genus *Serratia* and is related to the species *S. marcescens* and *S. nematodiphila*, and is probably a new subspecies of *Serratia*. Rhizobacteria of the genus *Serratia* have been efficient in reducing populations of phytopathogenic nematodes. Currently, only minimal studies have been conducted on this genus of *Serratia* bacteria, and based on the information described, the nematocidal activity of *Serratia* sp. against *N. aberrans* (J₂) was evaluated *in vitro* and *in vivo*. Finally, the nematocidal activity of *Serratia* sp. was evaluated *in vivo* against *N. aberrans* in chili plants (*Capsicum annum*). With respect to the gall bladder, number of egg masses and eggs produced by *N. aberrans*, significant differences were found in terms of treatment and control (T1), and similar to T2 (chemical nematicide), having as best treatment T6 at a concentration of 4×10^9 cells/mL reducing more than 50% of the population and the reproduction rate, which allows us to conclude that *Serratia* sp. is a good candidate to control gall bladder nematode populations such as *N. aberrans* in plants in chili.

Keywords: Biological control; nematodes; sustainability; safety.

Índice

1.- INTRODUCCIÓN	8
2. ANTECEDENTES.....	10
2.1 <i>NACOBBUS ABERRANS</i>	10
2.1.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE <i>N. ABERRANS</i>	10
2.1.2 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE <i>NACOBBUS ABERRANS</i>	11
2.1.3 MORFOLOGÍA.....	11
2.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.....	13
2.3 BIOLOGÍA DE <i>NACOBBUS ABERRANS</i>	14
2.3.1 HUEVO	14
2.3.2 PRIMER ESTADIO JUVENIL (J1)	14
2.3.3 SEGUNDO ESTADO JUVENIL (J2)	14
2.3.4 TERCER ESTADIO JUVENIL (J3).....	15
2.3.5 CUARTO ESTADIO JUVENIL (J4).....	15
2.3.6 HEMBRA JOVEN O VERMIFORME	16
2.3.7 HEMBRA ADULTA O ARRIÑONADA.....	16
2.3.8 MACHO	17
2.4 IMPORTANCIA ECONÓMICA DE <i>NACOBBUS ABERRANS</i>	18
2.5 HOSPEDANTES DE <i>NACOBBUS ABERRANS</i>	18
2.6 INTERACCIÓN NEMATODO-PLANTA HOSPEDANTE.....	19
2.7 DAÑO Y SÍNTOMAS CAUSADOS POR <i>NACOBBUS ABERRANS</i>	20
2.8 CONTROL DE <i>NACOBBUS ABERRANS</i>	20
2.8.1 CONTROL CULTURAL.....	20
2.9 CONTROL BIOLÓGICO	21
3. CONTROL QUÍMICO	22
3.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL CHILE	23
3.1.1 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DEL CULTIVO	23
3.1.2 CARACTERÍSTICAS DEL CULTIVO DE CHILE.....	24
3.1.3 IMPORTANCIA ECONÓMICA	25
3.2 <i>SERRATIA</i> SP.	25
3.2.1 EL GÉNERO <i>SERRATIA</i>	25
3.2.2 MECANISMOS DE CONTROL BIOLÓGICO SOBRE <i>NACOBBUS ABERRANS</i>	27
3.2.3 QUITINA	27
3.2.4 QUITINASAS	29
3.- JUSTIFICACIÓN.....	30
4.- HIPÓTESIS	31
5.- OBJETIVOS.....	32
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	32

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
5. MATERIALES Y MÉTODOS	33
6.1 LOCALIZACIÓN	33
6.2 OBTENCIÓN DE <i>SERRATIA SP.</i>	34
6.2.1 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE <i>SERRATIA SP.</i> MEDIANTE EL GEN RPOB.....	34
6.3 INÓCULO DE <i>NACOBBUS ABERRANS (J2)</i>	34
6.4 ACTIVIDAD NEMATICIDA DE <i>SERRATIA SP.</i>	35
6.5 PRODUCCIÓN DE QUITINASAS EN <i>SERRATIA SP.</i>	36
6.5.1 PREPARACIÓN DE INÓCULO	36
6.5.2 PREPARACIÓN DEL MEDIO CON QUITINA COLOIDAL (QC)	36
6.5.3 PREPARACIÓN DEL REACTIVO DNS	36
6.5.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	37
6.6 EXPERIMENTO <i>IN VIVO</i>	37
6.6.1 EVALUACIÓN <i>IN VIVO</i> DEL POTENCIAL NEMATICIDA DE LA <i>SERRATIA SP.</i> EN PLANTAS DE CHILE (<i>CAPSICUM ANNUMM</i>)	37
6.6.2 MATERIAL VEGETAL	38
6.6.3 INOCULACIÓN DE <i>SERRATIA SP.</i>	38
6.6.4 INOCULACIÓN DE <i>NACOBBUS ABERRANS (J₂)</i>	38
6.6.5 EXPERIMENTO	39
6.6.4 EVALUACIÓN DE LA PENETRACIÓN DE <i>N. ABERRANS</i> EN RAÍCES DE CHILE A LOS 7 Y 21 DÍAS DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN.....	39
6.6.5 EVALUACIÓN DEL DAÑO CAUSADO POR <i>NACOBBUS ABERRANS</i>	40
6.7 DISEÑO EXPERIMENTAL	40
7.- RESULTADOS.....	41
7.1 EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i> DEL POTENCIAL NEMATICIDA DE <i>SERRATIA SP.</i>	43
7.1.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	44
7.2 EXPERIMENTO <i>IN VIVO</i>	44
7.2.2 PENETRACIÓN DE <i>N. ABERRANS</i>	44
7.3 AGALLAMIENTO, MASAS DE HUEVOS Y HUEVOS DE <i>N. ABERRANS</i>	46
7.4 ÍNDICE DE REPRODUCCIÓN	49
8. DISCUSIONES.....	51
9.- CONCLUSIONES	55
10.- BIBLIOGRAFÍA	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Nacobbus aberrans</i>	12
Figura 2. A) y B) Juveniles de segundo estadio (J2) de <i>N. aberrans</i> vista en un microscopio compuesto (4X)	13
Figura 3. Ciclo biológico de <i>Nacobbus aberrans</i>	17
Figura 4. Localización.....	33
Figura 5. Disposición de tratamientos.....	35
Figura 6. Análisis filogenético, utilizando las secuencias de nucleótidos del gen 16s.	41
Figura 7. Análisis filogenético, utilizando las secuencias de nucleótidos del gen Rpob.	42
Figura 8. Evaluación in vitro de <i>Serratia</i> sp. sobre <i>Nacobbus aberrans</i>	43
Figura 9. Penetración de <i>Nacobbus aberrans</i> 7 ddi de <i>Serratia</i> sp. en plantas de chile.	45
Figura 10. Penetración de <i>Nacobbus aberrans</i> en raíces de chile 21 ddi de <i>Serratia</i> sp.....	46
Figura 11. Número de agallas/g de raíz en plantas de chile a los 42 ddi con <i>N. aberrans</i>	47
Figura 12. Número de Masas de huevos/gr de raíz de plantas de chile.....	48
Figura 13. Número de huevos/gr de raíz de plantas de chile a los 42 ddi de <i>N. aberrans</i>	49

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de <i>Nacobbus aberrans</i>	13
Cuadro 2. Descripción taxonómica de Chile.....	23
Cuadro 3. Descripción taxonómica de <i>Serratia marcescens</i>	26
Cuadro 4. Disposición de los tratamientos establecidos en las pruebas <i>in vitro</i>	36
Cuadro 5. Disposición de los tratamientos establecidos en la prueba <i>in vivo</i> .	39
Cuadro 6. Actividad enzimática de <i>Serratia</i> sp. en diferentes días.	44
Cuadro 7. Índice de reproducción.....	50

1.- INTRODUCCIÓN

El nematodo falso agallador *Nacobbus aberrans* representa una amenaza para la agricultura nacional e internacional, debido a que posee una alta capacidad reproductiva, una amplia gama de hospedantes, potencial de pérdidas en rendimiento y amplia distribución geográfica, al menos 40 países han establecido medidas cuarentenarias para prevenir su ingreso. Estos factores han hecho que *N. aberrans* sea considerado como uno de los diez nematodos más importantes en el área de fitosanidad y lo convierten en un patógeno importante y de difícil manejo (Jones *et al.*, 2013).

En México *N. aberrans* es responsable de producir importantes pérdidas en la producción de numerosos cultivos que van desde un 33 a 65%, ya que su rango de hospedantes es amplio; parasita a 84 especies de plantas cultivadas y malezas, pertenecientes a 18 familias diferentes, los principales cultivos atacados son: papa (*Solanum tuberosum*), betabel (*Beta vulgaris*), chile (*Capsicum annuum*), (Gómez-Valdez, 2016), tomate (*Solanum lycopersicum*), y frijol (*Phaseolus vulgaris*) (Manzanilla-López *et al.*, 2002).

El manejo de los nematodos fitófagos en los actuales sistemas de producción se basa, tanto el uso de plantas resistentes (Gómez-Rodríguez *et al.*, 2016), la aplicación de nematicidas; sin embargo, los agroquímicos ocasionan un impacto negativo a la salud humana y al medio ambiente.

Por este motivo es importante implementar la búsqueda de alternativas de manejo de plagas, una de ellas es el control biológico que utiliza antagonistas naturales como los hongos (macromicetos y micromicetos), virus, insectos, tardígrados, protozoarios, bacterias, nematodos depredadores de otros nematodos y ácaros (García Ortiz *et al.*, 2015; Aguilar Marcelino *et al.*, 2015), este tipo de control es considerado una estrategia para el reemplazo de los nematicidas existente en el mercado, el uso de antagonistas naturales poseen la ventaja de ser económicos y

seguros para el ambiente; la ventaja es que no genera efectos residuales tóxicos y no es nocivo para los organismos benéficos que habitan en el suelo y para el ser humano (Gómez-Valdez, 2016).

Dentro de los agentes de control biológico se encuentra la bacteria *Serratia marcescens* es un patógeno facultativo que produce una serie de exoproductos antimicrobianos, que incluyen quitinasas, proteasas, antibióticos pirrolnitrina y sideróforos para la competencia de hierro, asimismo se ha encontrado la presencia de la hormona de crecimiento vegetal indole-3-ácido acético (Liu *et al.*, 2010), lo que sugiere que múltiples mecanismos y sus efectos sinérgicos pueden estar involucrados en la eficiencia para reducir poblaciones de fitoparásitos por su habilidad de inducir resistencia sistémica en plantas frente a varios patógenos del suelo además de tener un potencial insecticida y nematocida (Khaldi *et al.*, 2015).

Por lo que en el presente estudio se evaluó *in vitro* e *in vivo* la actividad nematocida de la bacteria *S. marcescens* (cepa: 15.2) contra el nematodo agallador *N. aberrans*.

2. ANTECEDENTES

2.1 *Nacobbus aberrans*

2.1.1 Antecedentes Históricos de *N. aberrans*

Thorne en 1935, describió la primera especie a la que le dio el nombre de *Anguillulina aberrans* a partir de muestras colectadas de plantas nativas de *Atriplex confertifolia* en las laderas desérticas del lago Utah en Estados Unidos.

Después Thorne y Allen en 1944 proponen el género *Nacobbus* designado a *Nacobbus dorsalis* del Sur de California como especie tipo incluyendo además a *Anguillulina aberrans* dentro del género. En 1956 Thorne y Schuster, describieron una nueva especie, *Nacobbus batatiformis*, colectadas de remolacha azucarera provenientes de Mitchel, Nebraska (Jatala, 1985).

En 1959, Franklin descubrió que en Europa se encuentra una nueva especie de *Nacobbus* en raíces de plántulas de tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill.) que crecía en invernadero en Inglaterra y la denominó *N. serendipiticus*. Hasta el año 1970 se habían descrito cuatro especies del género *Nacobbus* (*N. serendipiticus*, *N. batatiformis*, *N. dorsalis* y *N. aberrans*). Sin embargo, Sher (1970) realizó una revisión del género, dejando solo dos especies, *N. dorsalis* y *N. aberrans*, y hace mención que estas dos especies son fácil de distinguir por las siguientes características.

El nematodo *N. dorsalis* se identifica por el número de las anulaciones que varía de 8 a 14 entre la vulva y el ano esto se observa mejor en las hembras inmaduras, la posición de la vulva en las hembras inmaduras es de 94-97% y cuerpo casi esférico; la hembra madura posee una elongación en la región posterior y en su interior está llena de huevos (Manzanilla-López *et al.*, 2005).

El nematodo *N. aberrans*, por su parte presenta de 15 a 24 anulaciones entre la vulva y el ano, la hembra madura tiene forma de huso y retiene los huevos en la región posterior del cuerpo únicamente (Manzanilla-López *et al.*, 2005).

2.1.2 Distribución Geográfica de *Nacobbus aberrans*

El nematodo *N. aberrans* ha sido encontrado en asociación con numerosos cultivos y plantas nativas en regiones templadas y subtropicales de Norte y Sur de América, por lo que Manzanilla-López (2010) y Jones *et al.*, (2013), consideran que *N. aberrans* se originó en América del Sur, desde donde posteriormente se extendió al resto de América, Europa y Asia.

En Norte de América *N. aberrans* ha sido notificado en los Estados Unidos y México (Caveness, 1959; Robbins, 1982). En México *N. aberrans* ha sido notificado en los Estados de Coahuila, Guanajuato, Hidalgo, México, Morelos, Puebla, Oaxaca, San Luís Potosí, Tlaxcala (Tovar-Soto, 2009), y en el Sur de América *N. aberrans* ha sido reportado en Perú, Bolivia, Noreste de Chile, Argentina y Ecuador (Manzanilla-López *et al.*, 2002).

2.1.3 Morfología

El género *Nacobbus* se caracteriza por presentar un marcado dimorfismo sexual (Manzanilla López *et al.*, 2002). Las hembras adultas son hinchadas, globosas o en forma de huso, con un solo ovario y vulva subterminal. Los machos son vermiformes con cola redondeada y presentan una bursa pequeña que envuelve la punta de la cola, en ambos sexos el estilete está bien desarrollado (Figura 1).

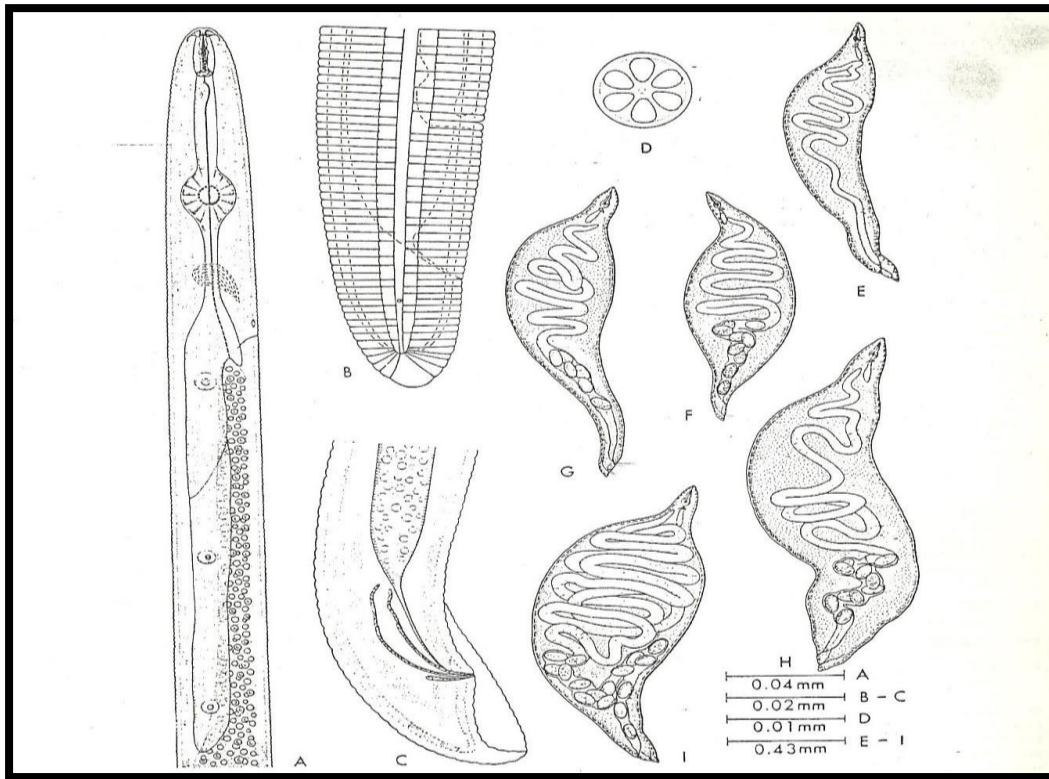


Figura 1. *Nacobbus aberrans*. A) Región posterior de hembra inmadura; B) Región posterior de hembra madura; C) Hembras maduras; D) Macho; E) Región anterior del macho; F) Esófago del macho; G) Región posterior del macho; H) Región anterior de juvenil de segundo estadio (J2); I) Región posterior de J2 (Manzanilla López *et al.*, 2002).

Las hembras inmaduras son vermiformes con región labial redondeada, hemisférica y continua, con tres o cuatro anillos. El bulbo medio es redondeado y bien desarrollado y con válvula prominente. La glándula esofageal es alargada y está sobrepuesta dorsalmente al intestino. El campo lateral presenta cuatro incisuras irregularmente areoladas y carecen de deridias. La parte posterior es redondeada con 10 a 17 anulaciones y con fasmidios en forma de poro en la porción anterior de la cola (Figura 1).

Los juveniles de segundo estadio (J2) son vermiformes con cola redondeada, ventralmente curvada y con una región hialina. La glándula esofageal es alargada y, sobrepuesta dorsalmente al intestino por arriba del 60% o más de la longitud del

cuerpo (Figura 2). El campo lateral tiene cuatro incisuras y las fasmidias se ubican a la mitad de la cola (Manzanilla López et al., 2002).

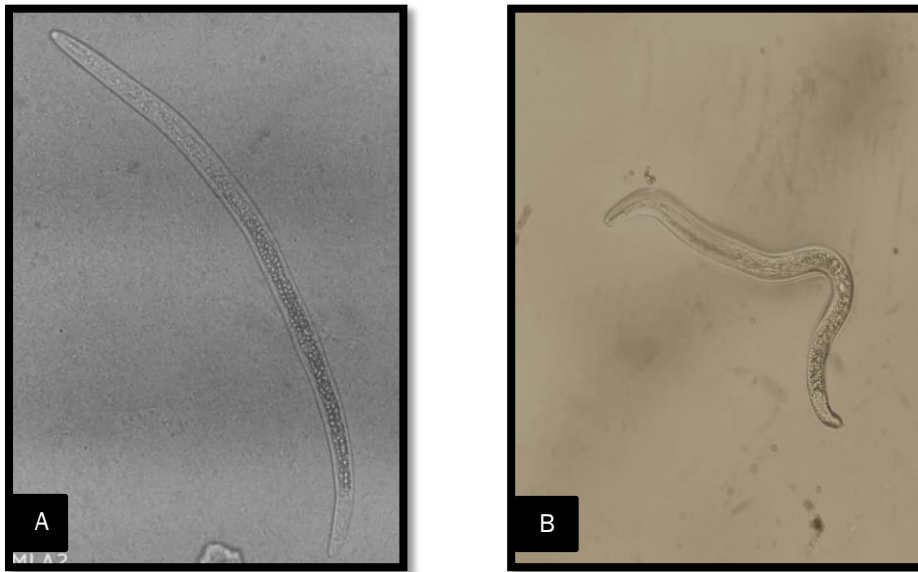


Figura 2. A) y B) Juveniles de segundo estadio (J2) de *N. aberrans* vista en un microscopio compuesto (4X) .

2.2 Clasificación Taxonómica

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *Nacobbus aberrans* (Decraemer y Hunt 2013).

Phylum:	Nematoda
Clase:	Chromadorea
Orden:	Rhabditida
Suborden:	Nematoda
Infraorden:	Tylenchina
Superfamilia:	Tylenchomorpha
Familia:	Pratylenchidae
Subfamilia:	Nacobbinae
Género:	<i>Nacobbus</i>
Especie:	<i>Aberrans</i>

2.3 Biología de *Nacobbus aberrans*

En función del hospedante, la temperatura del suelo y especie del nematodo, el ciclo de vida de *N. aberrans* tiene diferente duración de acuerdo a Cristóbal *et al.*, 2001 y Ortuño *et al.*, 2005. El ciclo de vida de *N. aberrans* comprende un estado de huevo, cuatro estados juveniles y un estado adulto, tras producirse cuatro mudas, la primera de ellas en el huevo (Figura 3).

2.3.1 Huevo

Es oval de 75 μ m de longitud. Los huevos son depositados por la hembra fuera de su cuerpo en una masa gelatinosa (matriz), expuesta fuera de los tejidos de la agalla, quedando en contacto con el suelo y rodeando la parte caudal de la hembra. Cada masa puede contener de 231 a 372 huevos, también la hembra puede retener algunos huevos en la parte posterior de su cuerpo (Mejía, 1996). Se ha notificado que la supervivencia del nematodo en el invierno, es en el estado de huevo que se conserva en las raíces de las plantas.

2.3.2 Primer estadio juvenil (J1)

Una semana después de la primera división celular durante el proceso de embriogénesis, se forma el primer estadio juvenil (J₁), que se desarrolla rápidamente y se enrosca tres o cuatro veces dentro de la cubierta del huevo.

2.3.3 Segundo estado juvenil (J2)

La primera muda (J1 a J2) ocurre dentro del huevo y se completa en tres a cuatro días. La eclosión del huevo libera al segundo estado juvenil en el suelo. Es pequeño de 0.34 mm de largo. Posee gran movilidad por lo que constituye el estado más infectivo.

Cuando contacta las raíces de las plantas, a menudo penetra inmediatamente, aunque los juveniles ingresan principalmente en la punta de la raíz, la penetración puede ocurrir por otros lugares: por puntos donde las raíces laterales emergen o por tejidos agallados rodeando hembras adultas.

Dentro de las raíces, los juveniles se mueven intracelularmente hasta encontrar una localización favorable para alimentarse. Una vez que la alimentación comienza, las células en el lugar de alimentación (tejido vascular) incrementan su tamaño seguido por la necrosis de las células corticales.

2.3.4 Tercer estadio juvenil (J3)

Proviene de la segunda muda que ocurre en la raíz o en el suelo, su longitud es de 0.55 mm, su intestino es más oscuro por el alto número de gránulos de grasa. Son menos activos que el J2, sin embargo, aún pueden dejar la raíz y reingresar, aunque mayormente tienden a permanecer en estado de quiescencia en forma de "C". El sexo puede ser determinado al fin de este estado, por el desarrollo de las gónadas, su tamaño relativo y su posición.

2.3.5 Cuarto estadio juvenil (J4)

Proviene de la tercera muda, que generalmente ocurre en la raíz y algunas veces en el suelo. Su longitud es de 0.65 mm y tienen también el intestino oscuro. Se mantienen encorvados en un estado de quiescencia dentro de la corteza. Se caracteriza por su inmovilidad, dando la impresión de estar muerto. Las gónadas de las hembras se extienden detrás del lugar donde se formará la vulva y las gónadas del macho crecen rápidamente hacia el ano. El J4 puede resistir más las condiciones adversas.

2.3.6 Hembra joven o vermiforme

Mide 0.8 mm de longitud, es vermiforme y permanece estirada, tiene desarrollada la vulva que es una hendidura transversal visible y ubicada en el extremo posterior del cuerpo muy cerca del ano. Tiene movilidad y por su capacidad de infectar es considerada como la segunda en importancia, después del segundo estadio juvenil (J2).

Pueden ser encontradas en el suelo a lo largo de todo el ciclo del cultivo, pero el máximo de su población en el suelo ocurre cerca de la cosecha. Reingresan a las raíces causando necrosis y ligeros ensanchamientos en la raíz 24 h después de su penetración y establecen su cabeza cerca de los tejidos vasculares.

2.3.7 Hembra adulta o arriñonada

Mide más de 1 mm de longitud y manifiesta un marcado dimorfismo sexual. La hembra vermiforme una vez que ubica la parte posterior de su cuerpo en la periferia de la corteza, esta se hincha en la parte media como consecuencia del desarrollo del ovario (un solo ovario), quedando con los extremos aguzados. Son sedentarias, estáticas sin cambiar de posición dentro los tejidos, a medida que ellas se alimentan las células circundantes se alargan y se desarrolla la agalla.

Las partes posteriores de la hembra se alargan hacia la corteza y periferia, ocasionando una abertura en la superficie de la raíz a través de la que los huevos, son descargados dentro de una matriz gelatinosa exudada por el nematodo.

La hembra puede también retener los huevos dentro de la parte posterior e interior de su cuerpo. La matriz gelatinosa es suave, fácilmente quebradiza, sin color y a medida que envejece se torna amarillenta.

2.3.8 Macho

Tienen movilidad, son vermiformes con una longitud de 0.85 mm, generalmente se presentan en posición abierta y encorvada. La espícula es visible y la bursa o membrana copulativa es poco desarrollada. Se ubican en las agallas radicales, cerca de la hembra, y cuando el saco de huevos es producido, ellos se amontonan alrededor de este, se han encontrados hasta seis machos en una matriz, sugiriendo que la fertilización ocurre en este punto.

Los mecanismos de sobrevivencia de este nematodo están relacionados con las masas de huevos que se encuentran adheridas a residuos de raíces en descomposición de diversos hospedantes, lo que les permite soportar condiciones adversas cuando no hay presencia de cultivos, los huevos pueden entrar en un estado de anhidrobiosis en el cual resisten la desecación.

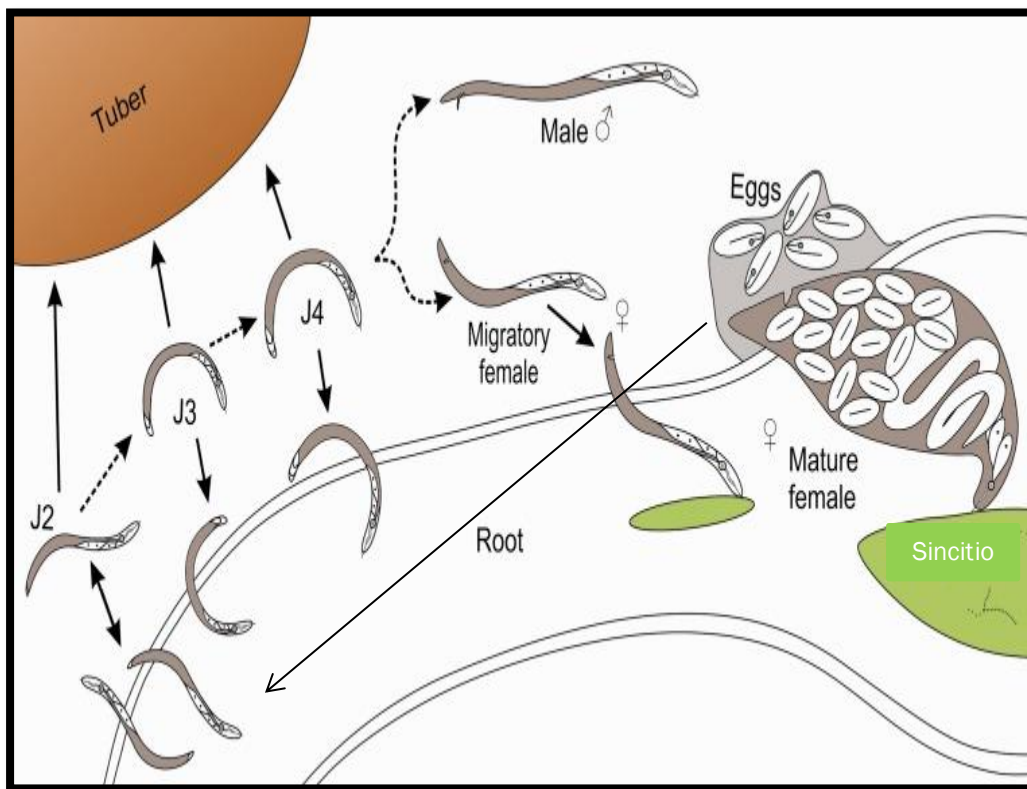


Figura 3. Ciclo biológico de *Nacobbus aberrans*, las flechas discontinuas representan transiciones a lo largo del ciclo de vida, mientras que las flechas sólidas representan el movimiento del nematodo (Van den Akker *et al.*, 2014).

2.4 Importancia económica de *Nacobbus aberrans*

La importancia de este nematodo radica en que posee una alta capacidad reproductiva y un amplio rango de hospedantes, que lo convierte en una plaga importante difícil de controlar, ya que en condiciones ambientales adecuadas una hembra tiene la capacidad de producir cientos de huevos, produciendo además enfermedades que llevan a la baja de producción de los cultivos que son dañados (Sanchez, 2010).

El nematodo *N. aberrans* es un endoparásito sedentario, constituye una plaga de importancia económica en Perú, Bolivia, Argentina, Chile, México y Ecuador en América del Sur y en la India, Rusia, Estados Unidos, Inglaterra y Holanda (Manzanilla-López *et al.*, 2002). Por otro lado Jones *et al.*, 2013 indica que las pérdidas de rendimiento causadas por *N. aberrans* en cultivos alimenticios e industriales fluctúan de 33 a 65%.

2.5 Hospedantes de *Nacobbus aberrans*

El nematodo *N. aberrans* posee un rango de hospederos que comprende 84 especies cultivadas y no cultivadas o malezas nativas en 18 familias en los sistemas agrícolas incluyendo plantas de las familias: Amaranthaceae, Apiaceae, Asteraceae, Basellaceae, Brassicaceae, Cactaceae, Caryophyllaceae, Chenopodiaceae, Convolvulaceae, Cucurbitaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Labiatae, Malvaceae, Nyctaginaceae, Oxalidaceae, Plantaginaceae, Polygonaceae, Portulacaceae, Solanaceae, Tropaeolaceae y Zygophyllaceae (Manzanilla-López *et al.*, 2010); afectando seriamente una gran cantidad de cultivos de importancia alimenticia y económica, como jitomate (*Solanum lycopersicum* L.), chile (*Capsicum annuum* L.), fríjol (*Phaseolus vulgaris* L.), papa (*Solanum tuberosum* L.), zanahoria (*Daucus carota* L.), pepino (*Cucumis sativus* L.), calabaza (*Cucurbita pepo* L.), lechuga (*Lactuca sativa* L.), betabel (*Beta*

vulgaris L.), col (*Brassica oleracea* L.) y mostaza (*Brassica nigra* (L.) (Montes-Belmont, 2000; Manzanilla-López *et al.*, 2002; Tovar-Soto, 2011).

Entre las no cultivables o malezas señalan a: varias especies de *Chenopodium* spp., callamato (*Callandria albis* - Euphorbiaceae), quelite morado (*Amaranthus hybridus*), mala mujer (*Solanum rostratum*), trompillo (*Solanum elaeagnifolium*), quesitos (*Malva parviflora*), amarradora (*Convolvulus equitans*), alfilerillo (*Erodium cicutarium*), quelite cenizo (*Chenopodium album*), y maromera (*Salsola iberica*) como hospedantes de *Nacobbus* sp. (Manzanilla, López 2010).

2.6 Interacción nematodo-planta hospedante

En las interacciones planta-nematodo, el estilete de los fitonematodos participa en la penetración de las paredes celulares de su hospedante, ayuda a ingerir el contenido celular y sirve además como un canal conductor de los efectores producidos en sus glándulas esofágicas, los cuales inducen la modificación de las células de alimentación de los fitonematodos, en el caso de los “agalladores” se conocen como células gigantes y básicamente son producto de divisiones nucleares repetidas sin citocinesis, mientras que los inducidos por nematodos que producen quistes y el agallador *Nacobbus* se conocen como sincitios, y son producto de la fusión de protoplastos y la disolución gradual de las paredes de las células que los integran; ambos sitios especializados de alimentación (SEA) constituyen células de alimentación altamente metabólicas y multinucleadas, que serán la única fuente de alimentación del nematodo y le aportarán los nutrientes requeridos para su crecimiento y desarrollo (Gheysen y Mitchum, 2011).

La planta responde expresando mecanismos de defensa como el incremento de la actividad de enzimas clave de la ruta de los fenilpropanoides, mediante la cual se sintetizan metabolitos secundarios con propiedades antimicrobianas y monómeros que conforman la lignina, que tienen un papel estructural y de defensa en las plantas. Dependiendo de los cambios que se induzcan en su síntesis será el tipo

de interacción planta-nematodo que se establezca (compatible o incompatible), en función de sí los cambios son o no favorables para la diferenciación del sitio especializado de alimentación (Mitchum *et al.*, 2013).

2.7 Daño y síntomas causados por *Nacobbus aberrans*

El daño que causan los estados juveniles (J2) y las hembras jóvenes de *N. aberrans*, son cavidades largas al moverse inter e intracelularmente por los tejidos del parénquima de la raíz, siendo estas últimas las que causan una hipertrofia que da lugar a la formación del síncito, sitio de alimentación de la hembra adulta y donde se forma la agalla típica lateral en la raíz. A pesar que el xilema y floema mantienen su continuidad vascular pero su funcionalidad disminuye (Ortuño *et al.*, 2005).

Los síntomas que causa *N. aberrans* son: plantas pequeñas, follaje con una tonalidad verde-amarillento (clorosis) que contrasta marcadamente con el verde intenso del follaje de las plantas sanas. En las raíces se observan agallas similares a las causadas por *Meloidogyne* sp. de forma alargada y se agrupan uniformemente a lo largo de las raíces secundarias, dando un aspecto de rosario, lo cual, es característico de esta enfermedad (Peña-Rodríguez, 2003).

2.8 Control de *Nacobbus aberrans*

2.8.1 Control cultural

2.8.1.1 Rotación de cultivos: En terrenos donde ese encuentran plantas con agallas, se debe seguir una rotación con cultivos que no sean susceptibles, como el maíz, trigo y avena, y no deben cultivarse plantas susceptibles por lo menos durante cinco años, así como la eliminación de malezas que son atacadas, y evitar al máximo el movimiento de personas y maquinaria, así como el manejo

inadecuado del agua de riego y trabajar al último las parcelas afectadas para evitar que se disemine a terrenos libres (Marbán-Mendoza *et al.*, 1989).

2.8.1.2 Plantas antagonistas y/o plantas trampa: La asociación de cultivos con *Tagetes* spp. se ha utilizado como una práctica cultural para el manejo de nematodos fitopatógenos, *T. erecta* asociado con los cultivos reduce las poblaciones e infección de *N. aberrans* hasta en un 76% (Zavaleta-Mejía y Gómez, 1995). Las leguminosas del género *Mucuna deeringiana* y *Concanavalia ensiformis* intercaladas en los cultivos reducen significativamente el agallamiento (Marbán-Mendoza *et al.*, 1989), principalmente por la presencia de *C. ensiformis*, debido a que esta especie produce lectina Concanavalina A, la cual tiene un efecto inhibitorio sobre los mecanismos que presenta el nematodo para encontrar al hospedante, al crear un microambiente desfavorable para el patógeno (Marbán-Mendoza *et al.*, 1989).

2.8.1.3 Enmiendas orgánicas: La utilización de enmiendas orgánicas es reconocida como una estrategia de gran utilidad para el control de patógenos de origen edáfico, principalmente aquellas que contienen un alto contenido en nitrógeno, ya que presentan un efecto nematicida significativo, como la incorporación de gallinaza y la incorporación de vermicomposta (Cabrera, 2014).

2.9 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 un método de control de plagas, enfermedades y malezas que consiste en utilizar organismos vivos con objeto de controlar las poblaciones

de otros organismos, este método es considerado como una estrategia para el reemplazo de los nematicidas, 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 (Khan y Haque, 2011).

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 que podemos encontrar en agua, suelo, plantas, insectos y pequeños mamíferos.

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 nematodo que parasita, b) foresia: *Serratia marcescens* puede hallarse en la cutícula de juveniles infectantes de *Steinernema* spp. reproducidos en laboratorio (Maheshwari *et al.*, 2013).

Entre las especies del género, se destaca *S. marcescens* por su habilidad de inducir resistencia sistémica en plantas frente a varios patógenos del suelo (Khaldi *et al.*, 2015). Además, tiene potencial insecticida (Sikorowski *et al.*, 2001; Tambong, 2013) y nematicida, con especies de *Meloidogyne*, otro género formador de agallas y de igual manera se ha descrito con *N. aberrans* (Gómez, 2016).

3. Control químico

Una de las medidas más utilizadas a nivel mundial para el control de nematodos fitoparásitos es el uso de nematicidas químicos aplicados al suelo, principalmente organofosforados (fenamifos, ethopfos, cadusafos), carbamatos (aldicarb, carbofuran, oxamil) y nematicidas fumigantes (ASP, 2013).

El control químico proporciona un control efectivo pero temporal, ocasiona un egreso alto de divisas por concepto de importación de nematicidas, incrementa los costos de producción, afecta la salud del hombre y contamina el ambiente (Manzanilla-López *et al.*, 2002).

3.1 Clasificación taxonómica del chile

El chile pertenece a la familia Solanaceae y al género *Capsicum*, a esta familia botánica pertenecen otras plantas importantes en la alimentación, como el jitomate, la papa, el tomate y la berenjena, así mismo comparten enfermedades y plagas que atacan a los cultivos anteriormente mencionados (Latournerie *et al.*, 2015).

Cuadro 2. Descripción taxonómica de chile (*Capsicum annuum*) (Montes, 2017).

División	<i>Angiospermae</i>
Clase	<i>Dicotyledoneae</i>
Subclase	<i>Metachlamydeae</i>
Orden	<i>Tubiflorae</i>
Familia	Solanaceae
Género	<i>Capsicum</i>
Especie	<i>Annuum</i>

3.1.1 Descripción botánica del cultivo

En México el chile es uno de los cultivos hortícolas más importantes y de mayor consumo popular, especialmente en estado fresco, aunque también se consume procesado en forma de salsas, polvos y en curtidos. En nuestro país existe una gran diversidad de chiles de diferentes tipos en cuanto a forma, sabor, color y tamaño (Monreal, 2008).

El chile es una planta dicotiledónea, se puede clasificar como anual cuando se maneja bajo cultivo y perenne si se encuentra en estado silvestre; tolera la mayoría de los climas, especialmente las que son producidas en zonas cálidas y climas secos (Mendoza, 2006).

3.1.2 Características del cultivo de chile

La raíz es de tipo pivotante, formada por raíces secundarias largas y fibrosas; alcanzan profundidades de 30 a 60 cm y hasta 3 m; se extienden lateralmente. El sistema radicular depende del genotipo, de las condiciones de cultivo y de la presencia de frutos (Nuez *et al.*, 1996). El tallo es erecto, herbáceo, con ramificaciones, semileñoso y de color verde oscuro, alcanza una altura de 50 a 90 cm y varía según el tipo o la especie (Ayala *et al.*, 2014). Presenta un tallo principal en donde inicia la formación de nudos que solamente desarrollan hojas y una rama lateral en donde cada una de ellas se presenta la yema apical que da origen a una flor (Pérez *et al.*, 1998). Las hojas son oblongas, lanceoladas, terminadas en punta, que se van adelgazando en la base, con un peciolo más o menos alargado (Ayala *et al.*, 2014). Las flores son hermafroditas y de color blanco, se forma en los nudos en donde se ramifica el tallo, el número de flores es de acuerdo a las características de las variedades, la planta de chile presenta autofecundación. El mayor porcentaje de autofecundación se presenta en las variedades de fruto pequeño y el menor, en las de frutos grandes (Morón y Alayón, 2014). El fruto es forma cónica o de cono truncado; cuerpo cilíndrico o aplanado de color verde intenso, constituida por un pericarpio grueso y un tejido placentario al que se unen las semillas; con bajo contenido de capsaicina, por lo que no es muy picante. A su maduración para cosecha en fresco, el fruto presenta un color verde oscuro brillante, y un color marrón café oscuro para deshidratación (Morón y Alayón, 2014).

3.1.3 Importancia económica

En México hay especies no presentes en otros lugares del mundo, por lo que es considerado centro de diversificación del género *Capsicum* especie *annuum* (Baltazar, 1995). El volumen de producción mundial de chiles y pimientos superó 32 millones de ton en 2014, con los rendimientos más significativos en China y México, Turquía, Indonesia, España y EUA (SIAP, 2017).

La producción de chile en sus diferentes variedades en México alcanzó 2.3 millones de toneladas, con un valor que rebasa los 22 mil 500 millones de pesos y junto con los pimientos se ubica en el quinto lugar dentro de los 20 principales productos que comercializa el país a nivel internacional (SADER, 2018).

El chile es uno de los vegetales más importantes en México, en área sembrada y valor económico para exportación. La gran variación en climas y condiciones para su desarrollo que va del nivel del mar a los 2000 msnm permite tener producción tanto para consumo local, como para exportación durante todo el año. La mayoría de tipos de chile son muy rendidores y por tanto económicamente importantes; esto lleva a considerar y poner en práctica todas aquellas medidas de protección que favorezcan el rendimiento máximo del cultivo (SIAP, 2017).

3.2 *Serratia* sp.

3.2.1 El género *Serratia*

El género *Serratia* está formado por bacilos Gram negativos de 0.9 – 2 µm de largo y 0.5 – 0.8 µm de diámetro y forma parte de la familia *Enterobacteriaceae* (Van Houdt *et al.*, 2007). Miembros del género *Serratia*, particularmente la especie *S. marcescens*, causan importantes infecciones en humanos, animales e insectos. Hay 14 especies y 2 subespecies reconocidas en el género, *S. entomophila*, *S. ficara*, *S. fonticola*, *S. glossinae*, *S. grimesii*, *S. liquefaciens*, *S. marcescens*

subsp. marcescens, *S. marcescens subsp. sakuensis*, *S. nematodiphila*, *S. odorifera*, *S. plymuthica*, *S. proteamaculans*, *S. quinivorans*, *S. rubidaea*, *S. ureilytica* (Mahlen, 2011). La mayoría de las especies de *Serratia* son mótils mediante flagelos peritricos, anaerobios facultativos, quimioorganótrofos con metabolismo de tipo respiratorio y fermentativo. Son habitantes ubicuos de suelo, agua y plantas y se encuentran normalmente asociadas con alimentos crudos, lo que causa el desperdicio de estos alimentos.

Serratia marcescens es una bacteria que produce quitinasas, las cuales hidrolizan los enlaces glicosídicos β -1,4 de la quitina, esta bacteria tiene un sistema quitinolítico completo formado de tres clases de enzimas (endoquitinasas, exoquitinasas y quitobiasas) y una proteína que se une a quitina. Varios estudios han mostrado cómo las quitinasas de diferentes bacterias, entre ellas las de *S. marcescens* han incrementado el efecto como nematicidas contra diferentes nematodos (Sánchez *et al.*, 2003).

Algunas cepas de *S. marcescens* son capaces de producir un pigmento llamado "prodigiosina", que varía en color desde el rojo oscuro al rosa pálido, dependiendo de la edad de las colonias *S. marcescens* tiene una predilección por el crecimiento en productos alimentarios de almidón, donde las colonias pigmentadas son fácilmente confundido con gotas de sangre (Mahlen, 2011).

Cuadro 3. Descripción taxonómica de *Serratia marcescens*.

Dominio:	Bacteria
Filo:	<i>Proteobacteria</i>
Clase:	<i>Proteobacteria</i>
Orden:	<i>Enterobacteriales</i>
Familia:	<i>Enterobacteriaceae</i>
Género:	<i>Serratia</i>
Especie:	<i>S. marcescens</i>

3.2.2 Mecanismos de control biológico sobre *Nacobbus aberrans*

Las bacteria del genero *Serratia* produce enzimas como las quitinasas que pueden degradar la cutícula de los insectos, cuya estructura está compuesta por quitina. La quitina está presente en el corión de los huevos de nematodos, por lo que estos son afectados con la utilización de dicha enzima.

3.2.3 Quitina

La quitina es el polímero más abundante en la naturaleza, después de la celulosa, está formada por aminoazúcares unidos entre sí por enlaces glicosídicos β -(1→4), que forman una cadena lineal de unidades de N-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glucosa, algunas de las cuales se encuentran desacetiladas y que desempeñan un papel importante en su estructura molecular, ya que le permiten formar auténticos tejidos que confieren resistencia y soporte como componente estructural al exoesqueleto de artrópodos, arácnidos, insectos, nematodos, anélidos y otros invertebrados; a la concha exterior de crustáceos, braquiópodos y moluscos, así como a las paredes celulares de muchos hongos, como ascomicetos, basidiomicetos, ficomicetos e imperfectos (Brurberg *et al.*, 2001).

Por su insolubilidad en agua, tamaño, complejidad molecular y composición heterogénea, la quitina no se degrada dentro de la célula, sino que los microorganismos recurren a la secreción de enzimas quitinolíticas con diferente especificidad para transformarla o hidrolizarla como fuente de carbono y nitrógeno. La quitinasa es una enzima capaz de hidrolizar quitina insoluble en sus componentes oligo y monoméricos (Chandrasekaran *et al.*, 2012).

La actividad de la quitinasa ha sido encontrada en numerosas bacterias y streptomicetos, hongos, plantas, invertebrados y vertebrados. Desempeña una función importante en el proceso de muda de los insectos y la ingestión de

alimentos quitinosos y puede también servir como enzima potencialmente de defensa contra patógenos que contengan quitina (Barboza *et al.*, 2007).

De igual manera (Someya *et al.*, 2000) encontraron actividades antifúngicas de la bacteria *S. marcescens* contra esclerocios de *Rizoctonia solani* y demuestran una supresión de los esclerocios por enzimas quitinolíticas presentes en de *S. marcescens*. Lo mismo que Aggarwal *et al.* (2015), mostraron actividad insecticida de *S. marcescens* contra todas las etapas de desarrollo de larvas de *Spodoptera litura*, al tener un menor peso de las larvas y pupas en diferentes etapas, debido a la actividad quitinolítica de la bacteria.

Como antecedentes esta bacteria fue evaluada de manera cualitativa bajo diferentes pruebas en las cuales salieron positivas, por ejemplo, se evaluó el antagonismo en dos diferentes hongos fitopatógenos; como *R. solani*, *Fusarium* sp., como también se evaluó el crecimiento de dicha bacteria en presencia de cuatro diferentes hidrocarburos aromáticos (fenantreno, antraceno, fenol y benceno), dando resultados positivos, otros experimentos que se realizaron con esta bacteria fueron: solubilización de fosfato, producción de AIA, producción de sideróforos y la producción de enzimas quitinasas, dando resultados positivos, es por estos motivos que la bacteria *Serratia* fue seleccionada para llevar a cabo la evaluación de la actividad nematocida contra *Nacobbus aberrans*.

Uno de los motivos para seleccionar *Serratia* es por la capacidad para degradar quitina, la cual se encuentra ampliamente entre varios grupos taxonómicos de procariotas incluyendo bacterias como: *enterobacterias*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces olivaceoviridis*, *Streptomyces lividans*, *Serratia marcescens*, *Serratia liquefaciens*, *clostridios* y *arqueobacterias*. Las bacterias emplean una gran cantidad de proteínas, incluyendo proteínas ligadoras de quitina para degradar este compuesto, pero la hidrólisis mediante quitinasas es el paso clave para la solubilización y mineralización de la quitina (San-lang *et al.*, 2001).

3.2.4 Quitinasas

Las quitinasas son enzimas que hidrolizan a la quitina, por lo tanto, se encuentran agrupadas dentro de la clase tres, que corresponde a las glicosil hidrolasas. Su secuencia aminoacídica permite clasificar el conjunto de las glicosil hidrolasas en familias y conforme a este criterio, las quitinasas se agrupan dentro de las familias 18, 19 y 20 (Polaina, 2004).

La familia 18 es diversa en términos evolutivos, ya que se encuentran quitinasas de organismos como bacterias, hongos, virus, animales y de algunas plantas. La familia 19 comprende quitinasas presentes en plantas y en *Streptomyces*. La familia 20 incluye a la β -N-acetilhexosaminidasa que se encuentra en *Streptomyces* y en el humano (Felse y Panda, 2000).

Las quitinasas se clasifican en dos grandes categorías de acuerdo al lugar en donde se lleva a cabo la reacción de hidrólisis en el sustrato:

- 1) Endoquitinasas
- 2) Exoquitinasas

Las endoquitinasas son enzimas que se unen de manera aleatoria a sitios internos, lo cual genera multímeros de bajo peso molecular de GlcNAc, tales como quitotetrosa, quitotriosa y diacetilquitobiosa. Las exoquitinasas a su vez se dividen en dos subcategorías, las quitobiosidasas y las β -1-4 N-glucosaminosidasas (Tokura y Tamura, 2007).

Las quitobiosidasas catalizan la liberación de diacetilquitobiosa iniciando con los extremos terminales no reducidos de las microfibras de quitina, y las β -1-4 N-glucosaminosidasas se unen a productos oligoméricos de endoquitinasas y quitobiosidasas, generando monómeros de GlcNAc. Además, existe una vía que involucra la desacetilación de la quitina a quitosana, la cual es convertida en residuos de glucosamina por acción de la quitosanasa (Fang *et al.*, 2009).

3.- JUSTIFICACIÓN

El nematodo fitopatógeno *Nacobbus aberrans* es una de las principales especies de importancia económica en México, debido al daño y las pérdidas que causa en la producción de diversos cultivos, como parte del control de estos nematodos se utilizan nematicidas químicos; sin embargo, el uso de estos nematicidas generan un impacto negativo a la salud humana y al medio ambiente, razones por las cuales se ha incrementado la búsqueda de nuevas alternativas como es el control biológico para este nematodo fitoparásitos mediante el uso antagonistas naturales como la bacteria *Serratia marcescens*, el uso de esta bacteria como agente de control biológico potencial es una herramienta biotecnológica que podría sustituir el uso de nematicidas químicos, en el presente estudio se evaluará *in vitro* e *in vivo* la actividad nematicida de la bacteria *Serratia* sp. contra el nematodo falso agallador *N. aberrans*.

4.- HIPÓTESIS

La bacteria *Serratia* sp. posee actividad nematocida *in vitro* e *in vivo* contra el nematodo agallador *Nacobbus aberrans* debido a su capacidad para degradar quitina.

5.- OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar *in vitro* e *in vivo* la actividad nematocida de la bacteria *Serratia* sp. contra el nematodo agallador *Nacobbus aberrans*.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar molecularmente mediante secuencia del gen *rpoB* la bacteria *Serratia* sp.
2. Evaluar *in vitro* la actividad nematocida de la bacteria *Serratia* sp. contra juveniles del segundo estadio (J2) de *N. aberrans*.
3. Determinar la producción de quitinasas en *Serratia* sp. por el método ácido 3,5 dinitro salicílico (DNS).
4. Evaluar *in vivo* la actividad nematocida de la bacteria *Serratia* sp. el nematodo agallador *N. aberrans* en plantas de chile (*Capsicum annuum*).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Localización

El presente proyecto de investigación se llevó a cabo en el Departamento de Helmintología (CENID-SALUD ANIMAL E INOCUIDAD, INIFAP.) Jiutepec, Morelos, el laboratorio de Control Biológico del Centro de Investigaciones en Biotecnología (CEIB) en la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) Cuernavaca Morelos, el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México, México y el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Tecnológica de la Selva, Ocosingo, Chiapas, México.



FIGURA 4. A) CENID-SALUD ANIMAL E INOCUIDAD, INIFAP, Jiutepec Morelos, B) CEIB- UAEM, Cuernavaca, Morelos C) Colpos, Campus Montecillo, México, D) Universidad Tecnológica de la Selva, Ocosingo Chiapas.

6.2 Obtención de *Serratia* sp.

Se colectaron nódulos de *M. pudica*, en la región selva del Estado de Chiapas, los nódulos fueron lavados y posteriormente desinfectados con hipoclorito de sodio al 5 % por 5 min, posteriormente se eliminó el exceso de cloro con agua destilada estéril y se adicionó etanol al 70% por 10 min, finalmente se lavaron cinco veces con agua destilada. Los nódulos desinfectados se maceraron en un mortero estéril y se realizaron diluciones decimales, para su siembra en medio PY. Se aislaron y seleccionaron cepas que presentaron resultados positivos a pruebas cualitativas de degradación de hidrocarburos, producción de AIA, solubilización de fosfato y producción de quitinasas.

6.2.1 Identificación molecular de *Serratia* sp. mediante el gen RPOB

Para el análisis por PCR del gen *rpoB*, se usaron los oligonucleótidos específicos *rpoB*-f (5'-AGG TCA ACT AGT TCA GTA TGG AC-3') y *rpoB*-r (5'-AAG AAC CGT AAC CGG CAA CTT-3') el programa de PCR consistió de una desnaturalización a 94°C por 12 min, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 s, alineamiento a 51°C por 45 s, extensión a 68°C por 50 min y extensión final a 68°C por 90 s. El producto de amplificación se extrajo del gel utilizando el kit GeneJET kit (Thermo Scientific), el producto purificado fue enviado a la Unidad de secuenciación al Instituto de Biotecnología de la UNAM, la secuencia obtenida fue analizada en la base de datos de GenBank del National Center Biotechnology Information. Con la secuencia obtenida se construyó un árbol filogenético con el método de Neighbour joining (Saitou y Nei 1987), utilizando la matriz Jukes y Cantor (1987), en el programa seaview 4 (Gouy *et al.*, 2010).

6.3 Inóculo de *Nacobbus aberrans* (J2)

El inóculo de *N. aberrans* se obtuvo de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* Mill.) de las raíces con agallas, se recolectaron en el Colegio de Postgraduados, Campus de Montecillo, Estado de México, población establecida a partir de una

sola masa de huevos, la extracción de huevos se realizó por el método descrito por (Vrain, 1977) e incubados a 27°C en placas de Petri con agua destilada estéril, hasta la eclosión y la obtención de juveniles del segundo estadios (J2) según (Villar-Luna *et al.*, 2009).

6.4 Actividad nematocida de *Serratia* sp.

La actividad nematocida de *Serratia* sp., en larvas del estadio (J2) de *N. aberrans* se obtuvo de acuerdo a la siguiente metodología: se utilizó una placa de microtitulación de 96 pozos para la evaluación que consistió en colocar los diferentes tratamientos en cada pozo con dos repeticiones por tratamiento donde se colocaron 100 nematodos por pozo (Figura 5) y se incubaron a una temperatura de 28 °C, evaluando la siguiente secuencia de horas (H1,H3,H6,H9,H12,H15,H18,H21 y H24), posterior a esto los nematodos fueron lavados con agua destilada estéril para descartar que fuera un efecto nematostático.

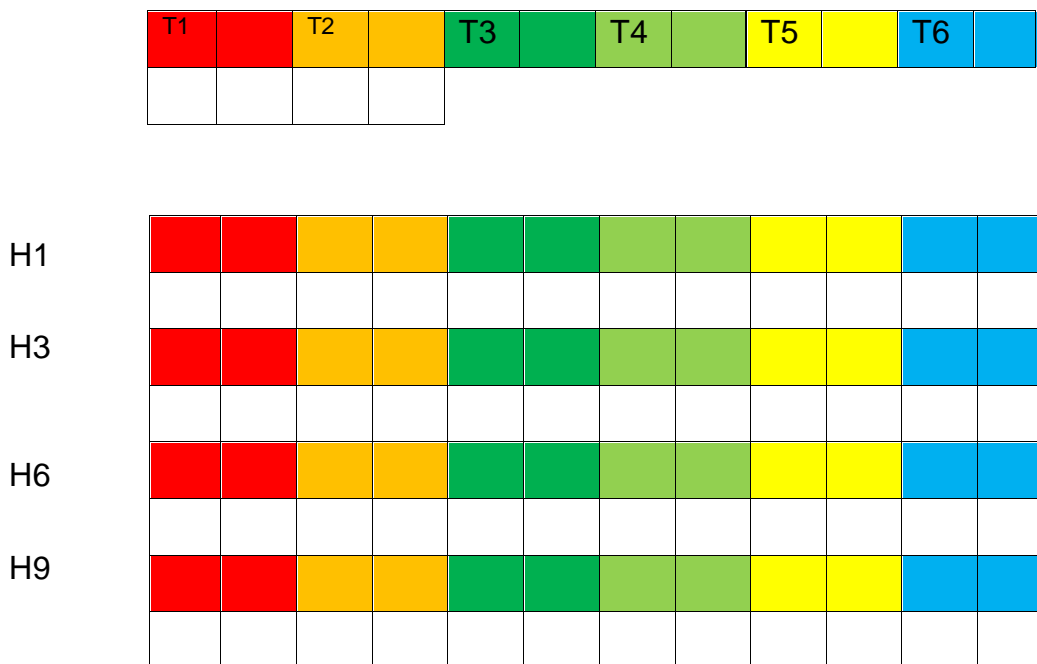


Figura 5. Disposición de los tratamientos establecidos y horas de evaluación en la prueba *in vitro*.

Cuadro 4. Tratamientos establecidos en las pruebas de evaluación *in vitro*.

Serie	grupo	bacteria	nematodo
1	testigo (agua)	no	si
2	testigo (nematicida)	no	si
3	tratado (sobrenadante)	no	si
4	tratado (D.O 0.5)	si	si
5	tratado (D.O 0.25)	si	si
6	tratado (D.O 0.125)	si	si

*D.O= Densidad óptica

6.5 Producción de quitinasas en *Serratia* sp.

6.5.1 Preparación de Inóculo

Se inoculo la bacteria en un tubo de ensaye con 10 mL de medio PY y se dejó Incubar a 30 °C a 200 rpm durante 24 h.

6.5.2 Preparación del medio con quitina coloidal (QC)

Una vez crecida la bacteria, el cultivo se inoculó nuevamente en un medio de cultivo que contenía quitina coloidal, extracto de levadura (0.5 g/L), Sulfato de amonio (1 g/L), sulfato de magnesio (0.3 g/L), Fosfato dipotásico (1.3 g/L) y Quitina coloidal (15 g/L), posteriormente se dejó Incubar a 30 °C a 200 rpm durante 24 h.

6.5.3 preparación del reactivo DNS

Para la preparación del reactivo DNS, se pesó 5 g de ácido 3,5 dinitro salicílico (DNS), 150 g de Tartrato de Na-K, 8 g de NaOH y se disolvió el NaOH en 200 mL

de agua destilada y se añadió en agitación el Tartrato de Na-K lentamente, se ajustó con agua destilada hasta 400 mL y se comenzó a adicionar lentamente el ácido 3,5 dinitrosalicílico, por último se aforó a 500 mL y se dejó en agitación toda la noche.

6.5.4 Determinación de la actividad enzimática

La producción de quitinasas de *Serratia* sp. se realizó mediante el método ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) que consistió en: tomar alícuotas de 1 mL del crecimiento bacteriano del medio de cultivo con quitina coloidal, posteriormente se centrifugó 10 min a 10,000 RPM, del sobrenadante obtenido se tomó una alícuota de 500 µL y se realizó una mezcla con 500 µl de Buffer de fosfato + Sustrato 1% (quitina). Esta mezcla se incubó 30 min a 50 °C y en intervalos de 5 min se tomaron 50 µL de la mezcla y se mezclaron con 50 µL de DNS. Esta segunda mezcla se incubó durante 5 min a 100 °C y a continuación se colocó en hielo para detener la reacción. Posteriormente se le adiciono 500 µL de agua a la mezcla 2 y se midió a 540 nm en el espectrofotómetro (al final se tomó en cuenta este factor de dilución) y para determinar la concentración se realizó una curva de concentración y los valores de absorbancia se extrapolaron a una curva de glucosamina.

6.6 Experimento *in vivo*

6.6.1 Evaluación *in vivo* del potencial nematocida de la *Serratia* sp. en plantas de chile (*Capsicum annum*)

El experimento *in vivo* se realizó en las instalaciones del área de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México, México.

6.6.2 Material vegetal

Se utilizó un variedad de chile tipo serrano cv. Tampiqueño susceptible a *N. aberrans*, para la germinación las semillas se colocaron sobre toallas de papel estéril humedecidas con agua destilada en recipientes de plástico y se incubaron a 27°C. Dos semanas después de la germinación, las plántulas se trasplantaron en macetas que contenían 25 cm³ de arena fina estéril (una planta por maceta) y se mantuvieron en cámara de crecimiento a una temperatura de 27 ± 1°C, con un fotoperíodo de 14 horas e intensidad luminosa de 6768 lux (luz fluorescente). Se fertilizo semanalmente con una solución nutritiva (3.15 g de Nitrofoska® 12-12-12-2 por litro de agua estéril.)

6.6.3 Inoculación de *Serratia* sp.

Las plantas de chile fueron inoculadas con la bacteria *Serratia* sp. a los 21 días después del transplante y una segunda inoculación a los cuatro días después de la primera, ambas inoculaciones fueron a una densidad óptica (D.O) de 0.5 con (2x10⁹ cel/mL), 0.75 con (3x10⁹ cel/mL) y 1 con (4x10⁹ cel/mL) a 600 nm. El diseño experimental fue completamente al azar y consto de seis tratamientos cada uno con 26 repeticiones para las diferentes pruebas.

6.6.4 Inoculación de *Nacobbus aberrans* (J₂)

La inoculación se realizó a los 5 días después de la inoculación con *Serratia* sp. en plántulas que tenían desarrolladas de dos a tres pares de hojas (6 semanas de edad), cada planta fue inoculadas con 1000 juvenil de segundo estadio (J₂) de *N. aberrans*. El inóculo se aplicó directamente al sustrato con una micropipeta de 1000 microlitros y se regó para mantener la humedad.

6.6.5 Experimento

El experimento se estableció durante 2018 - 2019. El diseño experimental fue completamente al azar y consistió de seis tratamientos con 26 macetas/tratamiento. Tratamientos: 1) Testigo (*N. aberrans*), 2) Testigo (nematicida), 3) Sobrenadante en donde creció la bacteria, 4) Bacteria a una densidad óptica (D.O) de 0.5 (2×10^9 cel/mL), 5) Bacteria a una D.O de 0.75 (3×10^9) cel/mL y 6) Bacteria a una D.O. de 1 (4×10^9 cel/mL) (Cuadro 5). El nematicida comercial que se utilizó fue nemacur (fenamifos: Etil-3-metil-4-(metiltio) feni (1-metiletil) fosforoamidato, a una concentración del 2%.

Cuadro 5. Disposición de los tratamientos establecidos en la prueba *in vivo*.

Serie	Tratamiento	bacteria	nematodo
1	Testigo	no	si
2	Testigo (nematicida)	no	si
3	Sobrenadante	no	si
4	Bacteria(2×10^9 cel/mL)	si	si
5	Bacteria(3×10^9 cel/mL)	si	si
6	Bacteria(4×10^9 cel/mL)	si	si

6.6.4 Evaluación de la penetración de *N. aberrans* en raíces de chile a los 7 y 21 días después de la inoculación

Se evaluó la penetración de los nematodos en las raíces de las plantas de chile a las 7 y 21 días después de la inoculación (ddi), se sacaron 8 plantas por tratamiento las cuales se les hicieron tinción de raíces para ver la penetración, posteriormente se colocaron las raíces en cloro al 1% durante 15 minutos, una vez que transcurrió el tiempo se enjuagaron con agua de la llave hasta que el olor a cloro no fuera perceptible, después de eso se incubaron 10 min en ácido acético al 1%, se decantó el ácido acético y se le adiciono fucsina acida y se incubo en baño

María a 60°C durante 15 min. Se dejó reposar 2 horas, se decantó la fucsina y se colocaron las raíces en glicerina para conservarlas, y se realizó el conteo de nematodos que habían penetrado las raíces.

6.6.5 Evaluación del daño causado por *Nacobbus aberrans*

Para determinar número de agallas y masas de huevos, se contaron las agallas y las masas de huevos en la raíz de cada una de las plantas inoculadas y el número total de agallas producidas de acuerdo al control negativo y el positivo. Las raíces se sumergieron en una solución de Floxina B (0.15 g/L de agua) durante 20 min para que las masas de huevos se tiñeran de rojo y se facilitará el conteo.

Para determinar el número de huevos, se realizó la extracción según Vrain (1977) y se contaron los huevos. Los resultados se expresaron en número de huevos por gramo de raíz (número de huevos/g raíz). El índice de reproducción se determinó como el porcentaje de huevos en las raíces tratadas con respecto al número de huevos que se formaron en el material altamente susceptible (control negativo) según (Taylor, 1971).

6.7 Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar (DCA) con variable discreta, realizando un análisis de varianza (ANOVA), una separación de medias con el método de Tukey y la prueba de hovtest para ver la homogeneidad en los tratamientos con un nivel de significancia de $P \leq 0.05$. Los datos se evaluaron con el programa "Statistical Analysis System" (SAS versión 9.0).

7.- RESULTADOS

La secuencia de los genes 16S rADN y *rpoB* se analizaron mediante el algoritmo BLASTn y mostró una alta similitud con especies del género *Serratia*. Se construyeron árboles filogenéticos utilizando fragmentos de las secuencias del gen ribosomal 16S y *rpoB*, el análisis filogenético de los genes muestra que la cepa NOD15 se encuentra relacionada con *Serratia marcescens* y *Serratia nematodiphila* (Fig. 6 y 7). Esto también se observa con los resultados de BLAST, donde se obtiene 99 % similitud con las especies antes mencionadas.

NJ 1026 sites J-C 1000 repl.

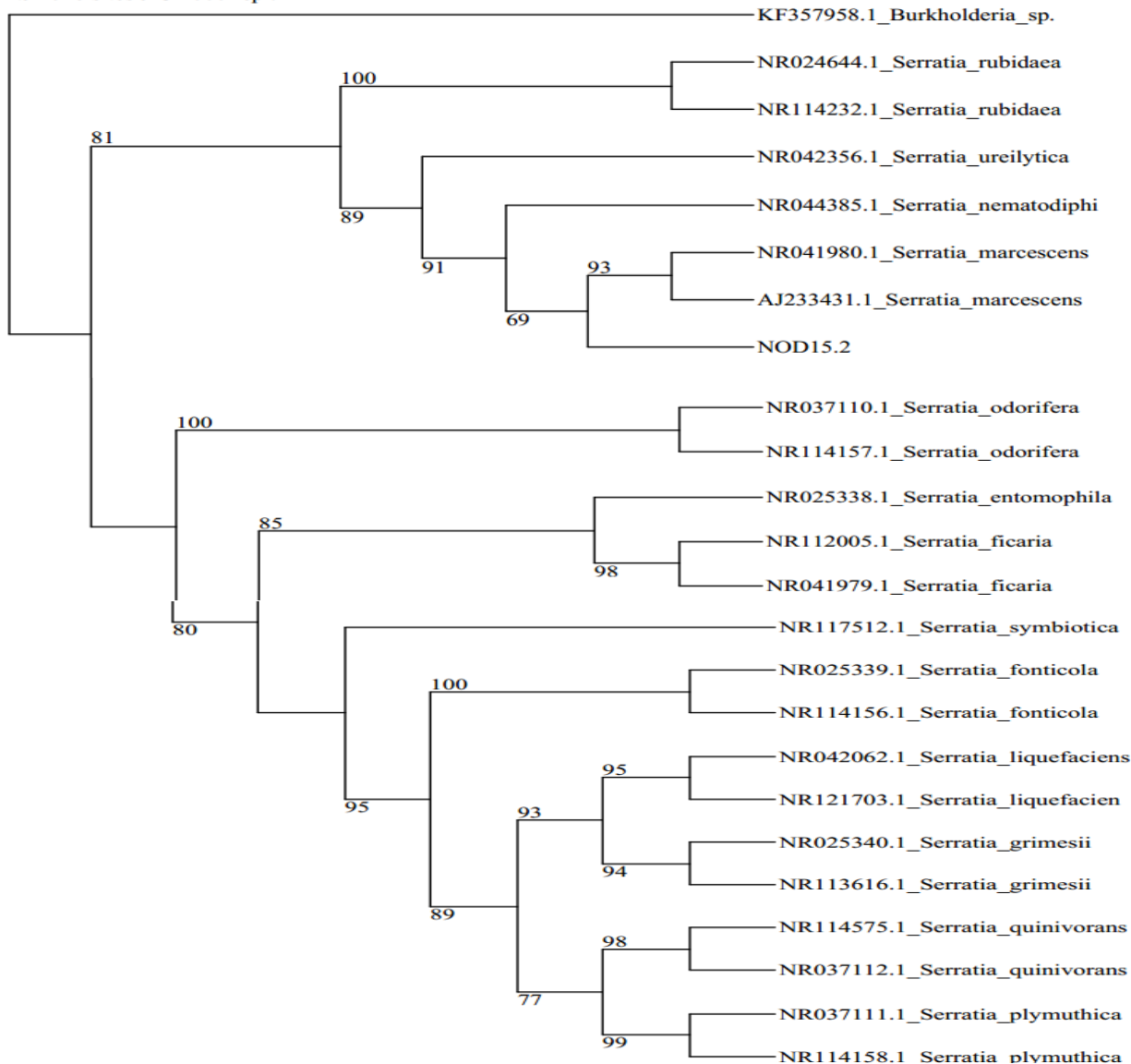


Figura 6. Análisis filogenético, utilizando las secuencias de nucleótidos del gen 16s.

NJ 480 sites J-C 1000 repl.

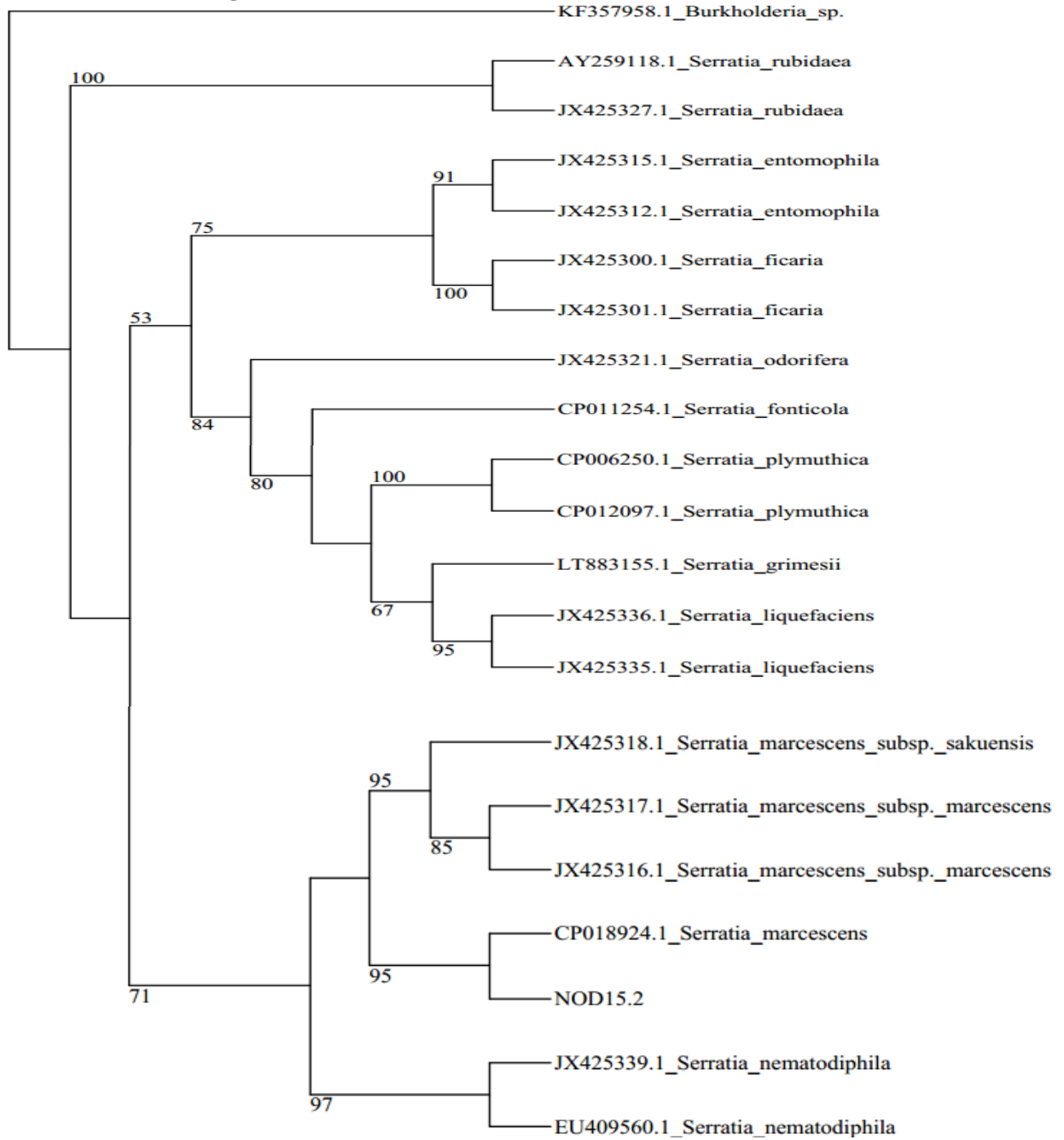


Figura 7. Análisis filogenético, utilizando las secuencias del gen *rpoB*.

7.1 Evaluación *in vitro* del potencial nematocida de *Serratia* sp.

Se obtuvieron resultados a la primer hora de la interacción bacteria-nematodo, y así sucesivamente se observó que la supervivencia del nematodo fue disminuyendo conforme pasaron las horas, como también se observó que tenían mayor efecto los tratamientos a comparación de los controles, sin embargo; el mejor tratamiento fue el que se le aplicó 4×10^9 cel/mL de bacteria obteniendo una mortalidad del 100% a las 15 horas a diferencia de los demás tratados que se observaron mortalidad de 100% a las 18, 21 y 24 horas (figura 7), el análisis estadísticos nos indican que el tratamiento 6 tiene diferencias significativas con respecto al control.

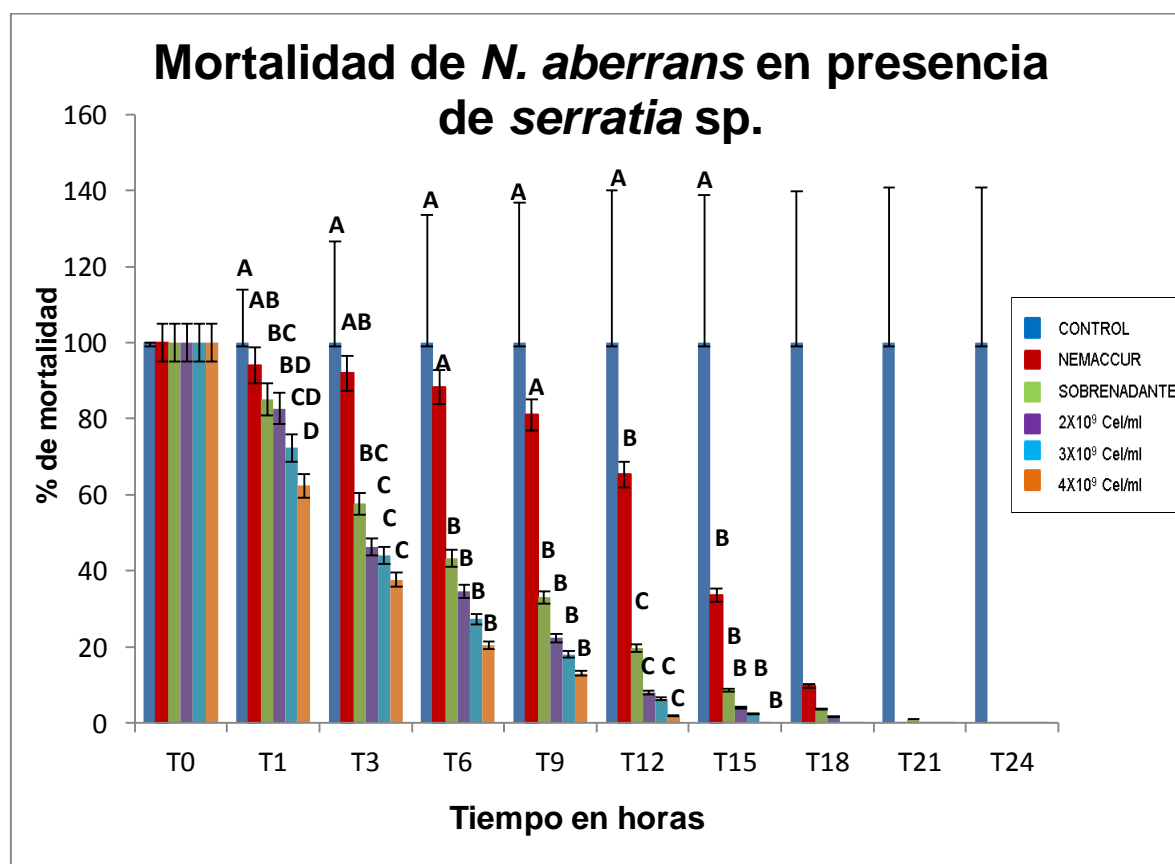


Figura 8. Evaluación *in vitro* de *Serratia* sp. sobre *Nacobbus aberrans* (J2) a las 18, 21 y 24 horas. Tratamientos con la misma letra no tienen diferencias significativas, (Tukey, $p < 0.05$), con un Coeficiente de Variación para cada tiempo= CV T1=6.37%, CV T3= 7.94%, CV T6=4.10%, CV T9= 3.87%, CV T12=6.18%, CV T15=14.27%.

7.1.2 Determinación de la actividad enzimática

Se evaluó la actividad enzimática de *Serratia* sp. el cual se pudo observar que desde el primer día se obtuvo actividad incrementando conforme pasaban los días hasta llegar a los 7 días de evaluación donde se obtuvo un actividad específica total de 812.12 U/mg, demostrando que tienen un buen potencial para biocontrol.

Cuadro 6. Actividad enzimática de *Serratia* sp. en diferentes días.

	<i>Serratia</i> sp.		
	Act. Volumétrica u/mL	Actividad Específica U/ μ g	Actividad Especifica U/mg
DÍA 1	0.0334	0.1369	136.8852
DÍA 2	0.0276	0.1190	118.9655
DÍA 3	0.0320	0.1404	140.3509
DÍA 4	0.0416	0.1935	193.4884
DÍA 5	0.0424	0.2019	201.9048
DÍA 6	0.0648	0.3224	322.3881
DÍA 7	0.1608	0.8121	812.1212

7.2 Experimento *in vivo*

7.2.1 Evaluación *in vivo* del potencial nematicida de *Serratia* sp. en plantas de chile (*Capsicum annum*)

Se realizaron las pruebas *in vivo* en plantas de chile obteniendo un total de 156 unidades experimentales para los diferentes tratamientos, de los cuales 96 fueron para las evaluaciones de penetración a los 7 y 21 días después de la inoculación (ddi) de *Serratia* sp. y 60 unidades para obtener el número de agallas producidas.

7.2.2 Penetración de *N. aberrans*

La penetración a los 7 ddi de *Serratia* sp. se pudo observar que presento una disminución grande de acuerdo al control, el tratamiento 6 (bacteria con 4×10^9

Cel/mL) muestra una diferencia significativa con respecto al tratamiento 1 (control) reduciendo más del 90 % de la penetración de *N.aberrans* de igual manera el tratamiento 6 en comparación del tratamiento 2 (nematicida) muestra diferencia significativa demostrando tener un mayor porcentaje de mortalidad.

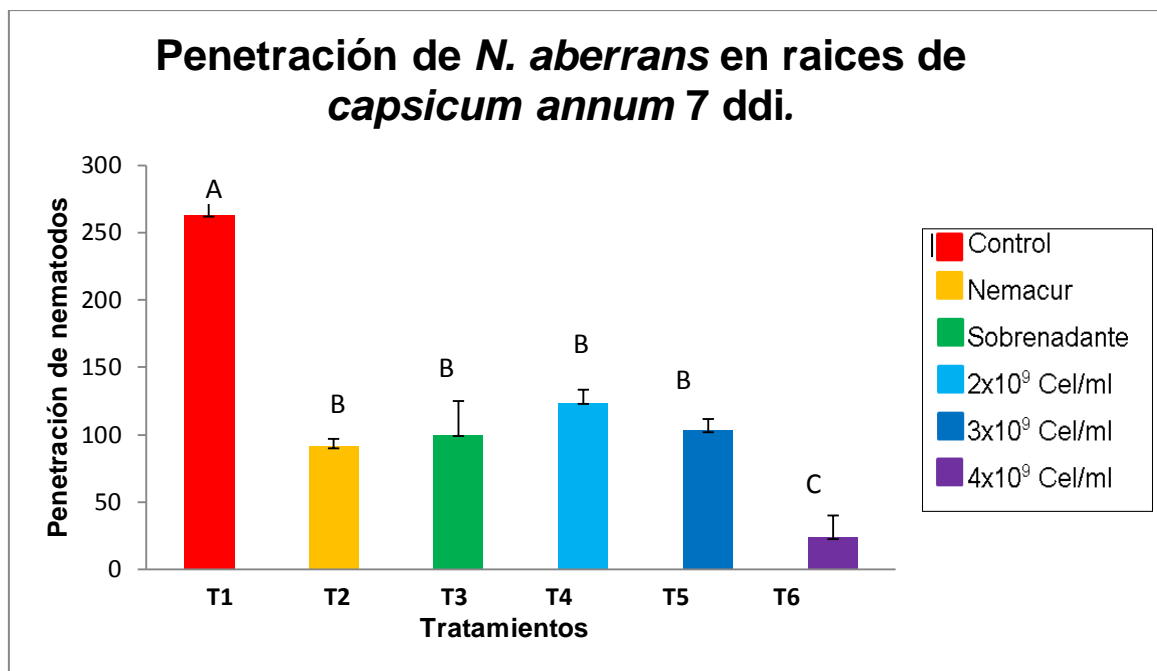


Figura 9. Penetración de *Nacobbus aberrans* 7 ddi de *Serratia* sp. en plantas de Chile. Tratamientos con la misma letra no tienen diferencias significativas, (Tukey, $p < 0.05$), con un Coeficiente de Variación = 8.92%.

El experimento a los 21 ddi de *Serratia* sp. se observó un comportamiento similar al de 7 ddi, sin embargo en este se encontraron menor número de nematodos que habían penetrado las raíces, esto se debe a que al inicio muchos nematodos entran al sistema radical de las plantas pero no todos se logran infectar (Manzanilla *et al.*, 2002), de acuerdo al diseño estadístico se observa que el tratamiento 6 con un 44% no tienen diferencias significativas del tratamiento 5 con el 56% de penetración, pero sí de los demás tratamientos incluyendo al tratamiento 3 que es el nematicida químico con un 67% de penetración, señalando que el tratamiento 6 (4×10^9 cel/mL) redujo un 56 % de la penetración de *N. aberrans*.

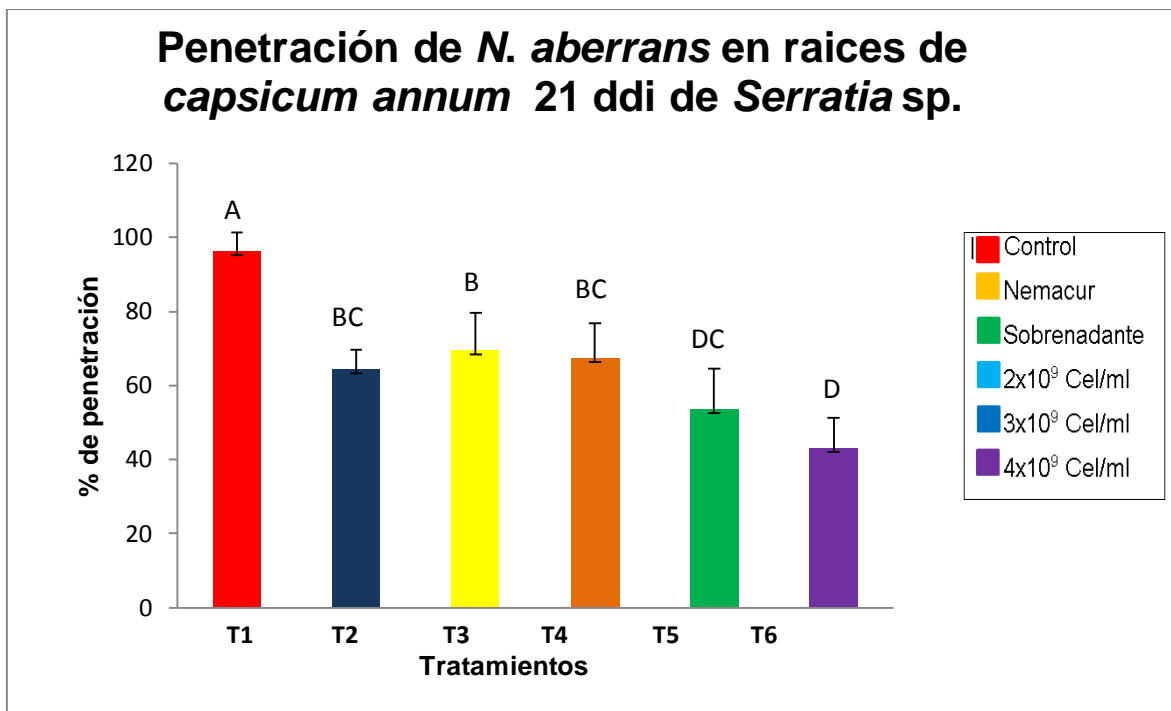


Figura 10. Penetración de *Nacobbus aberrans* en raíces de chile 21 ddi de *Serratia* sp. Tratamientos con la misma letra no tienen diferencias significativas, (Tukey, $p < 0.05$), con un Coeficiente de Variación = 6.96%.

7.3 Agallamiento, masas de huevos y huevos de *N. aberrans*

Se evaluó el número de agallas donde de acuerdo al análisis estadístico los tratamientos 3 con un 71%, el 4 con 62% y el 5 con el 66% de producción de agallas no presentan diferencias significativas del tratamiento control pero si de los tratamientos 2 con un 55% y el 6 con el 52% de agallas, esto indica que el tratamiento 6 (4×10^9 Cel/mL) tienen efectos similares al tratamiento con el nematocida químico (T2), reduciendo el 48% de agallas producidas en comparación con el control, además de estar sustentado con un coeficiente de variación de 16.76% dando confiabilidad a los resultados.

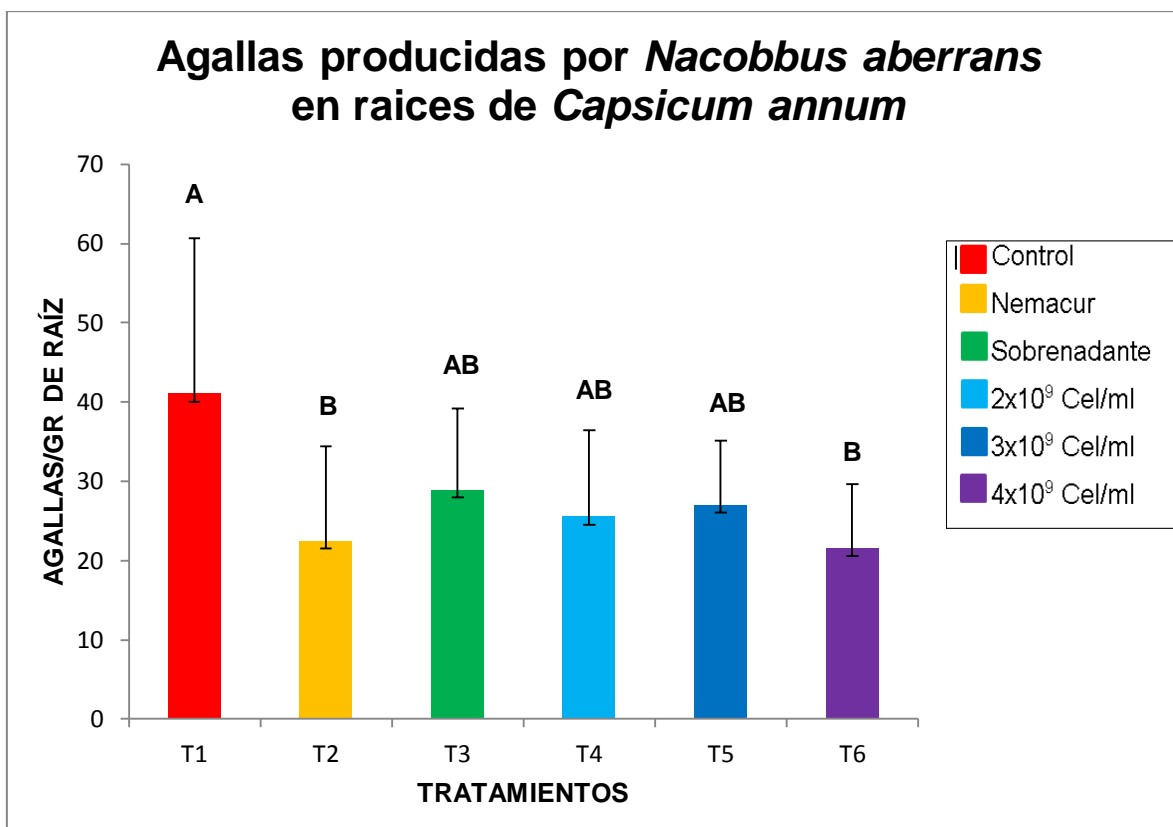


Figura 11. Número de agallas/g de raíz en plantas de chile a los 42 ddi con *N. aberrans*. Tratamientos con la misma letra no tienen diferencias significativas, (Tukey, $p < 0.05$), con un Coeficiente de Variación = 16.76%.

se realizó el conteo de masas de huevos de *Nacobbus aberrans* donde se observaron comportamientos similares al de las agallas, sin embargo; en el análisis estadístico se puede observar que los tratamientos 2, 3 y 5 no muestran diferencias significativas con respecto al control (T1), pero los tratamientos 4 con el 44% y 6 con el 38% de masas de huevos, el tratamiento 6 redujo un 62% y el 4 un 56% de masas de huevos a diferencia del control y del nematicida químico que solo redujo el 44%.

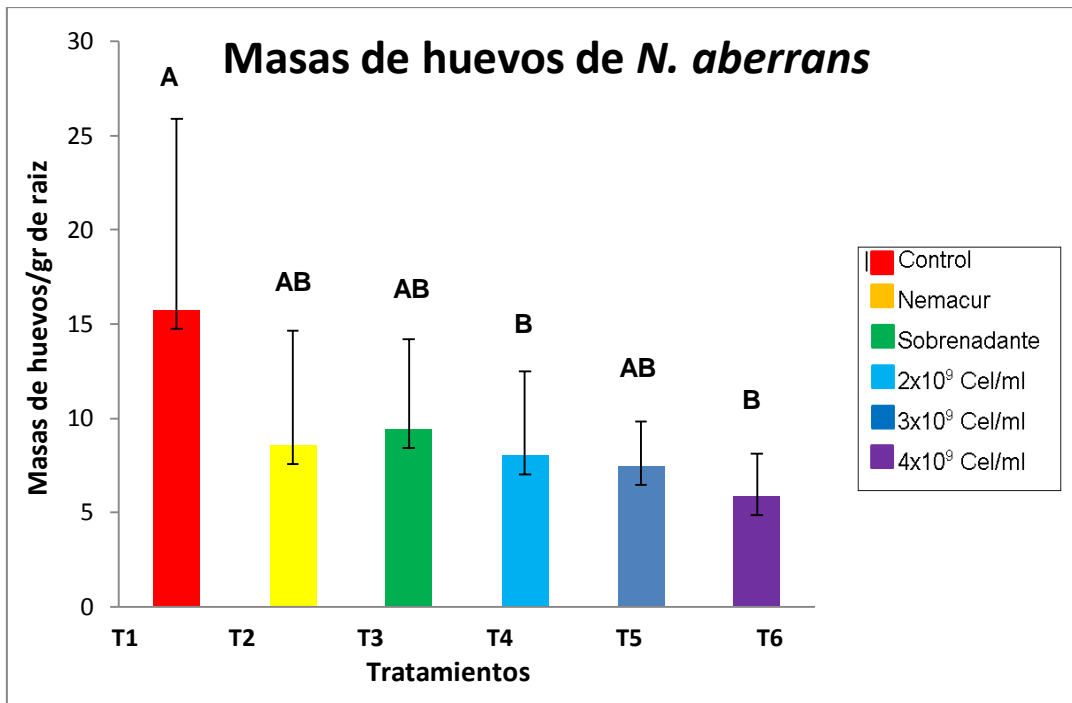


Figura 12. Número de Masas de huevos/gr de raíz de plantas de chile. Tratamientos con la misma letra no tienen diferencias significativas, (Tukey, $p < 0.05$), con un Coeficiente de Variación = 25.16%.

Para los huevos producidos por *N. aberrans* los tratamientos 2, 3, 4, 5, y 6 no muestran diferencias significativas esto indica que son similares que tienen efectos parecidos al tratamiento T2 (nematicida químico), por otro lado si podemos observar que hay diferencias significativas con respecto al control el cual no tuvo ningún tratamiento (T1), como también el tratamiento 6 con un 9 % de huevos alcanza a reducir más del 90% comparando con el tratamiento 2 que redujo el 75% y el 4 con el 74%, mostrando que son similares al tratamiento con el nematicida químico, además se pudo observar en los análisis estadísticos que el coeficiente de variación está con un 26.81% el cual nos indica resultados confiables.

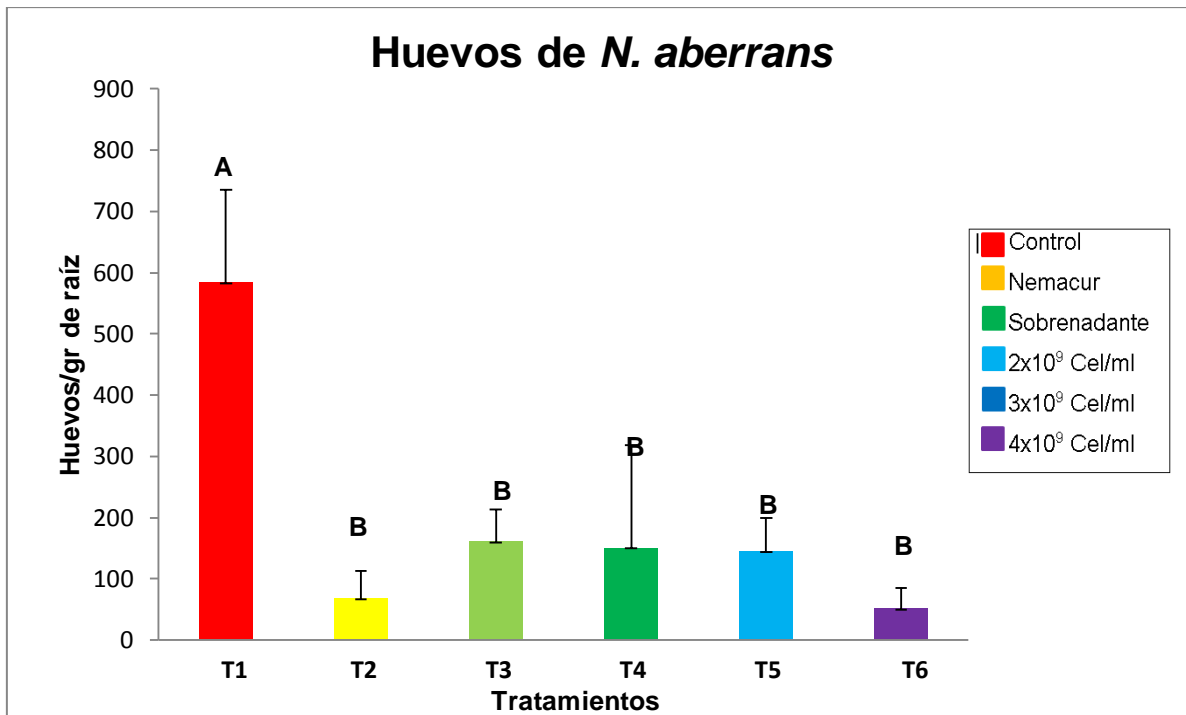


Figura 13. Número de huevos/gr de raíz de plantas de chile a los 42 ddi de *N. aberrans*. Tratamientos con la misma letra no tienen diferencias significativas, (Tukey, $P < 0.05$), con un Coeficiente de Variación = 26.81%.

7.4 Índice de reproducción

En el (cuadro 7) se puede observar el índice de reproducción de los diferentes tratamientos en el cual el tratamiento 6 con un índice de reproducción de 0.012 y el 4 con 0.017 de reproducción muestran diferencias significativas con el control, además se puede observar que estos tratamientos reducen más del 50 % del índice de reproducción.

Cuadro 7. Índice de reproducción. Tratamientos con la misma letra no tienen diferencias significativas, (Tukey, $P < 0.05$), con un coeficiente de variación de 25.16%.

Grupos	Tratamiento	Índice de reproducción
A	T1 Control	0.033
BA	T2 Nematicida	0.022
BA	T3 Sobrenadante	0.022
B	T4 2×10^9 cel/mL	0.017
BA	T5 3×10^9 cel/mL	0.018
B	T6 4×10^9 cel/MI	0.012

8. Discusiones

Con base a los resultados obtenidos del análisis filogenético de esta cepa fue realizado utilizando fragmentos del gen ribosomal 16S y gen *rpoB*, los cuales nos permitieron observar que pertenece al género *Serratia* y está relacionada con las especies de *Serratia marcescens* y *Serratia nematodiphila*, aunque en los cladogramas se observan claramente que esta cepa se encuentra estrechamente relacionada genéticamente con *Serratia marcescens*; diversas cepas de esta especie han sido reportadas como patógenos oportunistas en pacientes hospitalizados y se caracterizan por producir un pigmento denominado prodigiosina de color rojo, que tiene actividad contra bacterias, hongos, insectos y nematodos; sin embargo, la cepa evaluada en el presente estudio no produce este pigmento característico de las cepas asociadas a infecciones en humanos, pero si tiene efecto nematocida que puede estar relacionado con la producción de serrawettins W2, debido a que este compuesto ha sido reportado con actividad contra el nematodo de vida libre *Caenorhabditis elegans* (Carbonell *et al.*, 2000; Chandni *et al.*, 2012; Rahul *et al.*, 2014, Chun-Su *et al.*, 2017). A futuro se puede determinar los genes relacionados a la producción de exopolisacáridos y transportador de magnesio que fueron reportados como factores de patogenicidad en modelos de ratones (Anderson *et al.*, 2017), así como para una mayor exploración de sus aplicaciones biotecnológicas en agricultura y medicina, también es útil para comprender los mecanismos reguladores únicos que subyacen a la biosíntesis de compuestos activos (Chun-Su *et al.*, 2017).

Uno de los mecanismos que interviene en el biocontrol es la producción de quitinasas lo cual en este trabajo se cuantificó de la cepa de *Serratia* sp., la mayor actividad específica de esta enzima fue de 812.12 U/mg a los siete días del crecimiento (Tabla 6); esta producción es muy similar a la reportada en una cepa de *Serratia* sp., aislada también de nódulos de *Mimosa pudica*; pero en menor días de crecimiento por las cepas de *Enterobacter* aislada de esta misma leguminosa (Sánchez-Cruz *et al.*, 2019).

En un estudio analizaron la influencia de dos cepas de *Serratia* aisladas de *Anopheles sinensis* capturadas en el campo, este mosquito es el principal vector

de la malaria en Asia, estos mosquitos estaban infectados con el parásito *Plasmodium*. La cepa de *Serratia* (Y1) inhibió la infección por *P. berghei* en *A. stephensi*, mientras que la cepa *Serratia* (J1) no tuvo actividad en la infección parasitaria. La expresión génica y el análisis de interferencia de ARN muestran que la inhibición de *Plasmodium* por *Serratia* (Y1) está mediada por la activación bacteriana del sistema inmune contra mosquitos vector. Comprender las interacciones y los mecanismos a través de los cuales las bacterias intestinales comensales dan forma activa a la respuesta inmune de los mosquitos puede generar nuevos conocimientos sobre las interacciones vector-patógeno y puede ayudar en el desarrollo de nuevas intervenciones de enfermedades basadas en vectores (Bai *et al.*, 2019). Referente a este estudio es importante estudiar el mecanismo de acción de la bacteria aislada sobre el nematodo parásito *N. aberrans* para determinar el grado de patogenicidad contra este nematodo utilizando técnicas de vanguardia como las “oomics” (Aguilar-Marcelino *et al.*, 2019), donde su importancia varía según la patogenicidad para los fitonematodos como se observó en las pruebas realizadas donde se obtiene mortalidad en *N. aberrans* al igual al utilizar una suspensión de *Serratia marcescens* redujo el desarrollo y la reproducción de *M. incognita* en dos cultivos de tomate y aumentó los parámetros de crecimiento de las plantas (Abd-Elgawad y Kabeil, 2010).

En otro estudio notificado por Abebe *et al.*, (2011) menciona una asociación entre el nematodo de vida libre *C. briggsae*, y la bacteria *Serratia* sp. SCBI (aislado sudafricano de *C. briggsae*), esta bacteria presentó actividad letal contra el insecto *Galleria mellonella*. Aquí mostramos que *Serratia* sp., SCBI recubre el intestino de *C. briggsae*, similar al complejo que ocurre entre *Heterorhabditis-Photorhabdus*, lo que indica que la asociación es posiblemente interna. También mencionan que la interacción puede ser de manera tripartita, es decir, insecto-nematodo-bacteria, interacción en el contexto evolutivo más amplio y la historia natural del nematodo del genero *Caenorhabditis*.

De igual manera como se pudo observar la bacteria *serratia* sp. disminuyo de gran manera la producción de huevos, masas de huevos, y el índice de reproducción, a diferencia de los controles esta bacteria tiene la capacidad de ser utilizada como

agente biocontrolador como se puede observar en los resultados *in vitro* como *in vivo* de las diferentes variables evaluadas, *Serratia* sp. tiene un efecto nematicida contra *N. aberrans*. En condiciones *in vitro* se registraron porcentajes de mortalidad de juveniles del segundo estadio (J2) por arriba del 91 hasta el 100 % en las diferentes concentraciones de la bacteria y el sobrenadante donde creció esta (figura 8), un efecto similar se observó en las variables de porcentaje de penetración (figura 9,10) y número de huevos (figura 12) en raíces de chile en condiciones de cámara de crecimiento. Similares porcentajes de mortalidad (99.1%) en J2 de *M. incognita* se reportan con el uso de la especie *S. proteamaculans* (Zhao *et al.*, 2018), así como al utilizar el sobrenadante donde creció *Serratia* sp., Paiva y colaboradores (2013) reportan una actividad nematicida contra *Bursaphelenchus* spp. y atribuyeron la presencia de proteasas. En cuanto al porcentaje de penetración de nematodos por raíz de chile a los 7 días posteriores a la inoculación (dpi) del nematodo, todos los tratamientos presentaron significativamente el menor porcentaje en comparación al control (sin nematicida, sobrenadante ni bacteria) con reducciones del 53 al 91 % con respecto a este, en donde el tratamiento con la mayor concentración de la bacteria (4×10^9 Cel/mL) fue significativamente diferente al resto de los tratamientos, este mismo comportamiento se registró para la evaluación a los 21 dpi con reducciones desde un 28 a 55 % en comparación al control (figura 10). En cuanto al número de agallas por g^{-1} de raíz, sólo el uso del nematicida y la concentración más alta de la bacteria (4×10^9 Cel/mL, T6) fueron significativamente menores al control, con una reducción del 45 y 47 %, respectivamente, y el número de masas de huevos por g^{-1} de raíz también la concentración más alta de la bacteria fue significativamente menor con respecto al control, al igual que la más baja concentración de la bacteria (2×10^9 Cel/mL, T4) con reducciones del 62 y 56 %, respectivamente. Estudios similar reportan Almaghrabi *et al* (2013), en donde plantas de jitomate inoculadas con *M. incognita* y tratadas con la bacteria *S. marcescens* presentaron el menor número de agallas y masas de huevos por raíz. En general, el índice de reproducción tuvo un comportamiento parecido al número agallas y masas de huevos mientras que el número de huevos fue parecido al porcentaje de penetración. Los menores valores en las diferentes variables evaluadas tanto *in*

vitro como *in vivo* correspondieron al tratamiento con la concentración más alta de la bacteria (4×10^9 Cel/mL), por lo que el uso de *S. marcescens* (cepa: 15.2) en el manejo de *N. aberrans* es una alternativa biológica altamente recomendable dada su importancia económica de este fitonematodo.

Sin embargo los agentes biocontroladores como los organismos que interactúan con los nematodos fitoparásitos en el suelo deben tener algunas características básicas: no deben ser patógenos de plantas, hombres o animales, capaz de reducir o suprimir eficientemente las poblaciones de nematodos por debajo del nivel crítico, capacidad de adaptación a diferentes ambientes del suelo, buena habilidad competitiva, alto potencial de reproducción para obtener una población alta y capacidad de sobrevivir en épocas difíciles (Piedra-Naranjo, 2008).

9.- CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos tanto en las pruebas *in vitro* como en las *in vivo* se puede concluir que *Serratia* sp. es un candidato potencial para funcionar como agente de biocontrol, debido a la capacidad de producir enzimas quitinasas, que son las responsables de la degradación de la quitina componente de la pared celular del nematodo.

El análisis de las secuencias de los genes 16S y rpoB de la cepa 15.2 muestra que se encuentra relacionada genéticamente con *Serratia marcescens* y *Serratia nematodiphila* lo cual nos puede indicar que probablemente es una nueva subespecie de *Serratia*.

De acuerdo con los resultados obtenidos en cuanto al agallamiento, número de masas de huevos y huevos producidos por *Nacobbus aberrans* se puede concluir que se encontraron diferencias significativas en cuanto a los tratamientos tratados y el control (T1), y son muy parecidos al tratamiento 2 (nematicida químico) teniendo como mejor resultado el tratamiento 6 a una concentración de 4×10^9 cel/mL que se llegó a reducir más del 50% de la población y el índice de reproducción y con esto podemos decir que es un buen candidato para controlar las poblaciones del nematodos agallador *N. aberrans*.

10.- BIBLIOGRAFÍA

- Abd-elgawad, M.M.M. and Kabeil, S.S.A. (2010). Managment of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on tomato in egypt. Journal of american Science 6, 256-262.
- Abebe, E., Akele, F. A., Morrison, J., Cooper, V., Thomas, W. K., 2011. An insect pathogenic symbiosis between a *Caenorhabditis* and *Serratia*. Virulence. 2, 158-161. doi: 10.4161/viru.2.2.15337.
- Aguilar-Marcelino, L., Mendoza-de-Gives, P., Laith Khalil Tawfeeq Al-Ani, López-Arellano, M.E., Gómez-Rodríguez, O., Villar-Luna, Reyes-Guerrero, D.E., 2019. Using molecular techniques applied to beneficial microorganisms as biotechnological tools for controlling agricultural plant pathogens and pest. In: Molecular Aspects of Plant Beneficial Microbes in agriculture. Eds: Richa Salwan, Vivek Sharma, Wei Yang, Laith Khalil Tawfeeq Al-Ani. Elsevier, Cambridge, MA 02139, USA (In press).
- Almaghrabi, O. A., Massoud, S. I. and Abdelmoneim, T. S. 2013. Influence of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on tomato plant growth and nematode reproduction under greenhouse conditions. Saudi Journal of Biological Sciences 20: 57–61 doi:10.1016/j.sjbs.2012.10.004
- Anderson, M.T., Mitchell, L.A., Zhao, L., Mobley, H.L.T., 2017. Capsule production and glucose metabolism dictate fitness Turing *Serratia marcescens* bacteremia. mBio 8:e00740-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00740-17>.
- Anthoine, G, Mugniery, D. 2006. Crossing experiments with South American populations of *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne and Allen, 1944 (Nematoda : Pratylenchidae), 36:67-77.
- Agrios G .N. 2005. Fitopatología. 2da edición. México. Limusa. P 952.

- Ayala-Villegas, Misael J.; ayala-Garay, Óscar J.; Aguilar-Rincon, Víctor H. y Corona-Torres, Tarsicio, 2014. Evolución de la calidad de semilla de *Capsicum annuum* L. durante su desarrollo en el fruto. Rev. fitotec. mex [online], vol.37, n.1, ISSN 0187-7380, pp.79-87.
- Bai, L., Wang, L., Vega-Rodríguez, J., Wang, G., Wang, S., 2019. A Gut Symbiotic Bacterium *Serratia marcescens* Renders Mosquito Resistance to Plasmodium Infection Through Activation of Mosquito Immune Responses. Front. Microbiol. 10, 1580. doi: 10.3389/fmicb.2019.01580.
- Baltazar Montes B, Ramos Rivera P. 2017. Diversidad genética del cultivo del chile (*Capsicum spp*) determinada por isoenzimas y RFLP's tipos: serrano, jalapeño, manzano y silvestres en su área de distribución. Versión 1.3. Comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad. Occurrence Dataset <https://doi.org/10.15468/vq9fes> accessed via GBIF.org on 2018-05-13.
- Brurberg MB, Synstad B, Klemsdal SS, Aalten DMF, Sundheim L, Eijsink VGH. 2001. Chitinases from *Serratia marcescens*. Recent Res Dev Microbiol 5:187–204.
- Cabrera Hidalgo, A. J., E. Valadez Moctezuma, y N. Marbán Mendoza. 2015. Efecto del fluensulfone sobre la movilidad *in vitro*, y la reproducción y agallamiento de *Nacobbus aberrans* en microparcels. Nematropica 45:59-71.
- Carbonell, T., Della Colleta, H.H.M., Yano ,T., Darini, A.L.C., Levy, C.E., Fonseca, B.A.L., 2000. Clinical relevance and virulence factors of pigmented *Serratia marcescens*. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 28,143-149.
- Chandrasekaran R, Revathi K, Nisha S, Kirubakaran SA, Sathish-Narayanan S, Senthil-Nathan S. 2012. Physiological effect of chitinase purified from *Bacillus*

subtilis against the tobacco cutworm *Spodoptera litura* Fab. Pest Biochem Physiol 104:65–71.

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. Malays. J. Microbiol. 18,116-122.

Chetana Aggarwal, Sangeeta Paul, Vishwas Tripathi , Bishwajeet Paul , Aslam Khan. 2015. Chitinolytic activity in *Serratia marcescens* (strain SEN) and potency against different larval instars of *Spodoptera litura* with effect of sublethal doses on insect development. International Organization for Biological Control (IOBC). DOI 10.1007/s10526-015-9674-3, 60:631-640.

Chun, Su., Yibo, Liu., Yan, Sun., Zhi, Li., 2017. Complete genome sequence of *Serratia* sp. YD25 (KCTC 42987) presenting strong antagonistic activities to various pathogenic fungi and bacteria. J. Biotechnol. 245, 9-13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.01.011>.

E. A. Chavarro-Carrero, G. Valdovinos-Ponce, O. Gómez-Rodríguez, C. Nava-Díaz, V. H. Aguilar-Rincón, and E. Valadez-Moctezuma. 2017. Response of the Huacle chili pepper line 35-3 (*Capsicum annuum*) to two populations of *Nacobbus aberrans*. Nematropica 47:74-85.

El Khaldi R, Remadi MD, 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. J Plant Pathol Microbiol S3: 006. doi:10.4172/2157-7471.S3-006.

Fang W, Feng J, Fan Y, Zhang Y, Bidochka MJ, Leger RJ. 2009. Expressing a fusion protein with protease and chitinase activities increases the virulence of the insect pathogen *Beauveria bassiana*. J Invertebr Pathol.102(2):155-9.

- García, Ortiz N. Aguilar, Marcelino, L. Mendoza, de Gives, P. López, Arellano, M.E. Bautista, Garfias, C.R. González, Garduño, R. 2015. Actividad depredadora *in vitro* de *Lasioseius penicilliger* (Arachnida: Mesostigmata) contra tres especies de nemátodos: *Teladorsagia circumcincta*, *Meloidogyne* sp. y *Caenorhabditis elegans*. Veterinaria-México. Vol. 2 (1). doi: 10.21753/vmoa.2.1.340.
- Gomez-Rodríguez O, Corona-Torres T, Aguilar-RinCon T., 2016. Differential response of pepper (*Capsicum annuum* L.) lines to *Phytophthora capsici* and root-knot nematodes, Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo, Km 36.5 Carretera Mexico-Texcoco, Texcoco, Estado de Mexico, 56230, México. Crop Protection 92:148-152.
- Gómez Valdez, Laura., 2016. Potencial nematicida de un metabolito secundario producido por *Serratia* sp. (Enterobacteriales: *Enterobacteriaceae*) sobre *Nacobbus aberrans* (Tylenchida: Pratylenchidae). Centro de Zoología Aplicada. Universidad Nacional de Córdoba P: 7-10.
- Hallman J., Davies K.G., Sikora R. 2009. Biological control using microbial pathogens, endophytes and antagonists. In: Root-knot Nematodes. Perry R.N., Moens M., Starr J.L (eds.). Wallingford, UK, CAB International: 380-411.
- Howard, B. M., Hutcheson, S. 2003. Detection and characterization of chitinases and other chitin modifying enzymes. Journal Industrial Microbiology Biotechnology 30: 627-635.
- Jatala, P. 1985. En nematodo falso nodulador de la raíz. Colegio de Posgraduados, Montecillos, Estado de México. pp. 47-55.

- Jones, J.T., Haegeman, A., Danchin, E.G.J., Gaur, H.S., Jones, M.G.K., Kikuchi, T., Manzanilla-López, R., Palomares-Rius, J.E., Wesemael, W.M.L. and Perry, R.N. 2013. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. PMID:23809086, DOI: 10.1111/mpp.12057
- Latournerie M. L., J. S. López V., G. Castañón N., J. O. Mijangos C., G. Espadas V., A. Pérez G. y E. Ruiz S. 2015. Evaluación agronómica de germoplasma de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). Agroproductividad 1:24-29.
- Liu • J. Jia • S. Atkinson • M. Cámara • K. Gao • H. Li • J. Cao 2010. Biocontrol potential of an endophytic *Serratia* sp. G3 and its mode of action, World J Microbiol Biotechnol 26:1465-1471.
- Mujeebur Rahman Khan and Ziaul Haque. 2011. Soil application of *Pseudomonas fluorescens* and *Trichoderma harzianum* reduces root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, on tobacco. Department of Plant Protection, Aligarh Muslim University, 202002, India, 50:257-266.
- Mahlen, S. D. 2011. *Serratia* infections: from military experiments to current practice. Clin Microbiol Rev 24:91-755.
- Manzanilla-López, R. H., M. A. Costilla, M. Doucet, J. Franco, R. N. Inserta, P. S. Lehman, I. Cid del Prado-Vera, R. M. Souza, and K. Evans. 2002. The genus *Nacobbus* Thorne and Allen, 1944 (Nematoda: Pratylenchidae): Systematics, distribution, biology and management. Nematropica 32:149-227.
- 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. DOI 10.1007/978-3-642-33639-3_14.

- Mejia INCA, H. 1996. Efecto de niveles de población de *Nacobbus aberrans* en el suelo sobre el comportamiento de dos variedades de papa. Facultad de Ciencias Agrícolas, Pecuarias, Forestales y Veterinarias "Martín Cárdenas" UMSS. Cochabamba, Bolivia. P:86.
- Mendoza, R. 2006. Sistemática e historia del ají *Capsicum* Tourn. Revista Científica Universal. 11: 81-87.
- Monreal, V. C. T. 2008. Diagnóstico de enfermedades virales, bacterianas y fúngicas en jitomate y chile mediante técnicas moleculares. Revista Claridades Agropecuarias N° 73. P:60.
- Morón-Ríos, A.; Alayón-Gamboa, J.A. 2014. Productividad del chile jalapeño (*C. annuum* L.) con manejo orgánico o convencional en Calakmul, Campeche, México. Avances en Invest. Agropecuaria 18:35-40.
- Naranjo, Ricardo P. Manejo biológico de nematodos fitoparásitos con hongos y bacterias Tecnología en Marcha, Vol. 21-1, Enero-Marzo 2008, P. 123-132.
- Newman, L. H. 2009. El mundo de los insectos. Biblioteca Básica Salvat, Salvat Editores, España, P:28.
- Nuez, V., F., R. Gil O. y J. Costa G. 1996. El cultivo de pimiento, Chiles y Ajiles. Ediciones Mundi prensa. España, ISBN: 84-7114-609-6.
- Ortuño, N., Franco, J., Ramos, J., Oros, R., Main, G., Montecinos, R. 2005. Desarrollo del Manejo Integrado del Nematodo Rosario de la Papa *Nacobbus aberrans* en Bolivia. Documento de trabajo No. 26. Fundación PROIMPA-Proyecto PAPA ANDINA. Cochabamba Bolivia P:124.
- Paiva, G., Proença, D. N., Francisco, R., Verissimo, P., Santos, S. S., Fonseca, L., Abrantes, I. M. O. and Morais, P.V. 2013. Nematicidal Bacteria

Associated to Pinewood Nematode Produce Extracellular Proteases. PLOS ONE 8(11):1-11. doi:10.1371/journal.pone.0079705.

Peña, Rodriguez, F. 2003. Actividad nematocida *in vitro* e *in vivo* de formulaciones quitosan-larrea tridentata coville contra el nematodo falso nodulador *Nacobbus aberrans* (thorne, 1935) thorne & allen, 1944.). Departamento de Parasitología Buenavista, Saltillo, Coahuila, México, P:65.

Pérez, G. M., F. Márquez S., A. Peña L. 1998. Mejoramiento genético de hortalizas. 2da. Edición. Edit. UACH-Mundi-Prensa, ISBN:9789687462028, P:380.

Rahul, S., Chandrashekar, P., Hemant, B., Chandrakant, N., Shinde Laxmikant, S., Patil Satish, P., 2014. Nematicidal activity of microbial pigment from *Serratia marcescens*. Nat. Prod. Res. 28, 1399-1404, doi: 10.1080/14786419.2014.904310.

Sandoval, Pillajo, A.M. Lomas, Arias, L.J. 2007. Incidencia, severidad, rango de hospederos y especie del nematodo del rosario de la raíz (*Nacobbus* sp.) en el cultivo de tomate de mesa (*Lycopersicon esculentum*) en el valle del Chota y Pimampiro. Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales. Ibarra. Ecuador, P:7.

Sánchez-Cruz, R., Tapia Vázquez, I., Batista-García, R. A., Erick Williams Méndez-Santiago, E. W., Sánchez-Carbente, M. R., Leija, A., Lira-Ruan, V., Hernández, G., Wong-Villarreal, A., Folch-Mallol, J. L. (2019). Isolation and characterization of endophytes from nodules of *Mimosa pudica* with biotechnological potencial. Microbiol. Res. 218, 76-86.

Sanchez, Portillo, J.F. 2010. Efecto de quitina y quitosano sobre huevos de nematodos formadores de nódulos radiculares, *Nacobbus aberrans* y *Meloidogyne incognita*. *In vitro* e *in vivo*. Fitopatología. Montesillo Texcoco, Edo. de México, oai:www.biblio.colpos.mx:10521/55.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural Pesca y Alimentación. 2017. SIAP Boletín de Precios Internacionales.

Sepúlveda G. 2017. Aspectos generales de los virus de las plantas. Boletín INIA, N° P:224.

Sher, A., S. 1970. Revision of the genus *Nacobbus* Thorne and Allen, 1944 (Nematoda: Tylenchoidea). *J. Nematologica*. 3:228-235.

SIAP. Cierre de la producción agrícola. 2017. Disponible en línea: [http://www.siap.gob.mx/cierre de la producción agrícola por estado/](http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/) (consultado mayo de 2018).

Someya N, Kataoka N, Komagata T, Hibi T, Akutsu K . 2000. Control biológico de las enfermedades transmitidas por el ciclamen en el suelo por la cepa B2 de *Serratia marcescens*. *Plant Disease*, 84: 334-340.

Timper, A 2014 *Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes: 259 Building Coherence between Microbial Ecology and Molecular Mechanisms*, *Progress in Biological Control* 11, DOI 10.1007/978-1-4020-9648-8_11.

Tokura, S., Tamura, H. *Chitin and Chitosan*. Eds.; Birkhaus Verlag: Boston, 2007, P:449-468.

Tovar-Soto, A. 2011. Distribución y gama de hospedantes de *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne & Allen, 1944 en México. *Revista Mexicana de Fitopatología* (Aceptado *Rev. Mex. Fit.*).

Townsend, G. R., and J. W. Heuberger. 1943. Methods for estimating losses casused by diseases in fungicides experiments. *The Plant Disease Report* 27:340-343.

- Van Houdt, R., Givskov, M. & Michiels, C. W. 2007. Quorum sensing in *Serratia*. FEMS Microbiol Rev 31:407–24.
- Villar-Luna, H., B. Reyes-Trejo, O. Gómez- Rodríguez, E. Villar-Luna, y E. Zavaleta- Mejía. 2015. Expresión de genes de defensa y acumulación de capsidiol en la interacción compatible chile CM334/*Nacobbus aberrans* e incompatible chile CM334/*Meloidogyne incognita*. Nematropica 45:9-19.
- Zavaleta-Mejía, E. and Gómez, R. O. 1995. Effect of *Tagetes erecta* L.-Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) intercropping on some tomato pests. Fitopatología 30:35-45.
- Zavaleta-Mejía. E., B. A. Villa, H. M. Vargas, A. S. Ramírez, y R. O. Gómez. 2004. Efecto de la vermicomposta en el impacto de *Nacobbus aberrans* en jitomate. ONTA XXXVI Annual meeting. Puerto Vallarta, Jalisco, México. P:83.
- Zhao, D., Zhao, H., Zhao, D., Zhu, X., Wang, Y., Duan, Y., Xuan, Y. and Chen, L. 2018. Isolation and identification of bacteria from rhizosphere soil and their effect on plant growth promotion and root-knot nematode disease. Biological Control 119: 12-19.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA



Cuernavaca, Morelos, 22 de mayo del 2020

COMISIÓN REVISORA DE TESIS DE GRADO

Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez (Director)
Dra. Liliana Aguilar Marcelino (Codirector)
Dr. Arnoldo Wong Villarreal
Dr. Jorge Luis Folch Mallo
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo

Tesis: **ACTIVIDAD NEMATICIDA DE *SERRATIA* SP. CONTRA EL NEMATODO
AGALLADOR *Nacobbus aberrans***

Alumno que presenta la tesis a revisión: **ERICK WILLIAMS MÉNDEZ SANTIAGO**

Programa: **MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es
APROBADO

ATENTAMENTE

DR. VÍCTOR MANUEL HERNÁNDEZ VELÁZQUEZ

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

VICTOR MANUEL HERNANDEZ VELAZQUEZ | Fecha:2020-06-11 17:09:44 | Firmante

QkmFU2//lobLQUN3u9OnFGovhFaBKzdbAeirje2a8qYAAtAYLRrY0mNxvrBcQSC0IRO4d07g6f+gzibF5AHAIDCKd2YUjDA6avLWymvZMorpBelGc21Hal/suguOdaaTgxRM4sd8MGMkuuXraOroaXtwG579ZOPPELQ4AvzMyTAHQVJvbF802jdIMDwS92+Q3NuRFftoU7ehAzirH4Dm+7rjEfaqlY2GINi+roiuGVbrmx/X60oXgAlls+UGs1xGcWS9rqTW/hNKx1BjRt mwiOQuo3LBHJ7+RK9aUmJnWC1mRMuLovIRluMfRbS3AMiDP4tgs9mfFpBPHoCR2bLg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[MdTCnx](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/ZzE1zE3juUnm3h1R9fAZPiqyIC68AFDp>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA



Cuernavaca, Morelos, 22 de mayo del 2020

COMISIÓN REVISORA DE TESIS DE GRADO

Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez (Director)

Dra. Liliana Aguilar Marcelino (Codirector)

Dr. Arnoldo Wong Villarreal

Dr. Jorge Luis Folch Mallof

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo

Tesis: **ACTIVIDAD NEMATICIDA DE *SERRATIA* SP. CONTRA EL NEMATODO
AGALLADOR *Nacobbus aberrans***

Alumno que presenta la tesis a revisión: **ERICK WILLIAMS MÉNDEZ SANTIAGO**

Programa: **MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es
APROBADO

ATENTAMENTE

DRA. LILIANA AGUILAR MARCELINO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

LILIANA AGUILAR MARCELINO | Fecha:2020-06-18 19:51:58 | Firmante

toMf6fogVhdzXjGodLlpwAp7R+EshC4foTgY3l1p5/r6usSfl5Er7l15mWt7lrHbUZK/qdiKIQ3XX/mHAVm2ohw0666Ft1usQOPVFB5VUq0n7tgKjorx0Fpfg5aLdB8T8osB+Uk7y1y8VRhHcpNPdvl3zoQ59swdFZd0JC/UCbQm2IHvursL2OqkuR0itSsLoWm4Y7ix/dqTlcDyLLuWlgh2dBhZcG+jlhGlzidktr/R/OYKXMEp0Y1It7MTiIMFXbEgcbkrlJdJPFetm8oyKgjamaq4b4axSyeEh36yx1DsdYYsIRt2ukYvuBjqu6Q3jdFYt3QFwRnZzhD7SaKjow==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



HRKics

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Mf4a6XyzUfzEvp89uzK9ALB09CdLLUzR>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA



Cuernavaca, Morelos, 22 de mayo del 2020

COMISIÓN REVISORA DE TESIS DE GRADO

Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez (Director)

Dra. Liliana Aguilar Marcelino (Codirector)

Dr. Arnoldo Wong Villarreal

Dr. Jorge Luis Folch Mallof

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo

Tesis: **ACTIVIDAD NEMATICIDA DE *SERRATIA* SP. CONTRA EL NEMATODO
AGALLADOR *Nacobbus aberrans***

Alumno que presenta la tesis a revisión: **ERICK WILLIAMS MÉNDEZ SANTIAGO**

Programa: **MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es
APROBADO

ATENTAMENTE

DR. ARNOLDO WONG VILLARREAL



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ARNOLDO WONG VILLARREAL | Fecha:2020-06-18 19:12:48 | Firmante

V4SszNGWwvfgc4USJs4wsQcUKwKUYuOinHJFSMXGNaGAYaGKtjomaJ4mgTHYUHRVVDXwKvUcClya/Sg5q4ahJ7aUI0QR7yzW8xJ4RpfZBZsyFSwW9+J+WvY7X7ibXNbN bhmMAoVntw7P8wku4AeVKYNpiXuAMgwiA1mKscG/vLoaeijWVsBjIjFL38yJ7OM39M3K1Bd5xCp+Sz8iRd6Gvs0I4Oxwb55diWgUhi017zzPkop/gap+KsLpcQ9AyYmHUvc6VtF9n Mk3e4j6sqek+1+DGh1eFs3hOd1lIFpG3B1x/CFdZr3kOvGsJ5rGj6O+CGM56XgJmJPI+7BHO2l/evQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



zoCMsl

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/dDfLvgVky9vQJ9CSN2XN6cR1f3A4yyLz>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA



Cuernavaca, Morelos, 22 de mayo del 2020

COMISIÓN REVISORA DE TESIS DE GRADO

Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez (Director)
Dra. Liliana Aguilar Marcelino (Codirector)
Dr. Arnoldo Wong Villarreal
Dr. Jorge Luis Folch Mallo
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo

Tesis: **ACTIVIDAD NEMATICIDA DE *SERRATIA* SP. CONTRA EL NEMATODO
AGALLADOR *Nacobbus aberrans***

Alumno que presenta la tesis a revisión: **ERICK WILLIAMS MÉNDEZ SANTIAGO**

Programa: **MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es
APROBADO

ATENTAMENTE

DR. JOSÉ AUGUSTO RAMÍREZ TRUJILLO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JOSE AUGUSTO RAMIREZ TRUJILLO | Fecha:2020-06-10 14:51:43 | Firmante

eiewO5grTQxA5A8eFwd4D7NSpUUFNjxFGSc3QlugZ8zS7HvhyZ03dfYaeNLmyeDFAT/aO7pa3ezB6LC1PJk0c6dUmmY9a7ME62WQDCZWyKVb6Q5OPnfzvfufCW9fgLEpK37ryFONmzAp0hGQFG6JX21JvOLGRTJCY2JF54NcxVOg5ENdeCgc9xe37Y1dM/HqfwMkBsDSUFqK/mxWIX9tdn+ylvvhTd3BGQHeoPMh0WLD2wIAEnjzrL/5jiM7ZcjinNOUCY51fkTQ2jnPss74mo2mirW0JP4vi59gyzoMS0dmM+0VR195cvkBX0+lwmnEbDbMpVpkwx8myJUxdIFw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



GbMJSU

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/YG4oqyWivIzuGrYA1bz2mRf7HnEQoBGE>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA



Cuernavaca, Morelos, 22 de mayo del 2020

COMISIÓN REVISORA DE TESIS DE GRADO

Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez (Director)

Dra. Liliana Aguilar Marcelino (Codirector)

Dr. Arnoldo Wong Villarreal

Dr. Jorge Luis Folch Mallo

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo

Tesis: **ACTIVIDAD NEMATICIDA DE *SERRATIA* SP. CONTRA EL NEMATODO
AGALLADOR *Nacobbus aberrans***

Alumno que presenta la tesis a revisión: **ERICK WILLIAMS MÉNDEZ SANTIAGO**

Programa: **MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es
APROBADO

ATENTAMENTE

DR. JORGE LUIS FOLCH MALLOL



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JORGE LUIS FOLCH MALLOL | Fecha:2020-06-21 13:12:06 | Firmante

eApE5kUxozkbOZI6yJ8F12AlxP10bx5yIF/cOFuuTo5UQpq/GRkphHvPYAOE2GO3BShW0Z/lxMRJkJSotsSMTezXEU9tU39VS93uaL4SK5WKck/706iHwJpcNmgsu5x13XBeP1Ds
mR1aozuxhefNCflIA8tbP5lzvg+RH9zPAkVXKSGZSQzzEI7BSSbOijTsLX5Pkpbs4UvPiknD+WsXcBmhl6HScsDwpxi/Q2sbBXfdcMr5Bzh6FYVj1/l6w4V227huOl4nlipcpJ5F3yphFid
FzfogHdwVFa2+P4MZR6z7GQCnMUu7jYC77pIFql1niNLzIU69xbnbq42HRZdxeQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



CaYdVs

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/7Cu37wTTp67dnTOPLy6zfBEpHUgdLNw>

