



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



Doctorado en Ciencias Naturales

“Ciclo de vida *in vivo* de tres especies de nemátodos entomopatógenos nativos del estado de Morelos y su producción”

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS NATURALES**

P R E S E N T A:

Tania Marel Guadarrama Ávila

DIRECTOR:

DR. VÍCTOR MANUEL HERNÁNDEZ VELÁZQUEZ

Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos

Noviembre, 2023

ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN.....	1
2.- ANTECEDENTES	2
2.1 Nemátodos entomopatógenos	2
2.2 Biología de los NEPs	2
2.3 Conducta de NEPs	4
2.4 Clasificación de NEPs.....	5
2.5 Ciclo de vida de NEPs	5
2.5.1 Ciclos de vida de Heterorhabdítidos y Steinernemátidos.....	6
2.6 Bacterias simbiotes	8
2.6.1 <i>Xenorhabdus</i>	8
2.6.2 <i>Photorhabdus</i>	10
2.6.3 <i>Serratia</i> spp.	13
2.7 Especies de NEPs nativas.....	15
2.7.1 Cepas de NEPs nativas del estado de Morelos.....	16
2.8 Producción de NEPs.....	17
2.8.1 Producción de NEPs <i>in vivo</i>	17
2.9 Pruebas de producción <i>in vivo</i>	18
3.- JUSTIFICACIÓN	19
4.- HIPÓTESIS.....	20
5.- OBJETIVO GENERAL.....	20
6.- OBJETIVOS PARTICULARES.....	20
7.- MATERIALES Y MÉTODOS	21
7.1 <i>Galleria mellonella</i>	22
7.2 Propagación de NEPs.....	22
7.3 Descripción del ciclo de vida	23
7.3.1 Infección de <i>G. mellonella</i>	23
7.3.2 Fijación de NEPs	24
7.3.3 Aclaramiento de los NEPs.....	24
7.3.4 Parámetros evaluados en los NEPs	24
7.4 Propagación <i>in vivo</i>	25
7.4.1 Análisis estadístico	26
7.5 Propagación <i>in vitro</i>	26

7.5.1 Medio sólido bidimensional	26
8.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
8.1 Ciclo de vida de <i>Heterorhabditoides</i> sp.....	27
8.2 Ciclo de vida de <i>Oscheius myriophila</i>	32
8.3 Ciclo de vida de <i>Caenorhabditis brenneri</i>	36
8.4 Propagación <i>in vivo</i> de <i>Heterorhabditoides</i> sp.....	38
8.5 Propagación <i>in vivo</i> de <i>Caenorhabditis brenneri</i>	45
8.6 Propagación <i>in vivo</i> de <i>Oscheius myriophila</i>	46
8.7 Propagación <i>in vitro</i> en medio sólido bidimensional	51
9.- CONCLUSIONES	53
10.- PERSPECTIVAS	54
12.- ANEXOS	55
13.- BIBLIOGRAFÍA.....	56

1.- INTRODUCCIÓN

Los nemátodos entomopatógenos (NEPs) son una alternativa prometedora en el control de insectos plaga debido a su amplio intervalo de hospederos y a su forma de buscarlos activamente (Shapiro-Ilan y Gaugler, 2002). Si bien, desde la década de 1980 se ha generado una gran cantidad de información sobre NEPs, la mayoría se centra en las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae, los cuales se asocian a sus bacterias simbiotas *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* respectivamente; sin embargo, en la década anterior se han reportado otros géneros de NEPs asociados a otras especies de bacterias simbiotas, como *Serratia* (Picoaga *et al.*, 2007).

Derivado de trabajos de búsqueda e identificación de NEPs, se cuenta en el Laboratorio de Control Biológico del Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos (CEIB/UAEM), con tres géneros de NEPs, no reportados aún en México, siendo estos *Caenorhabditis brenneri*, *Oscheius myriophila* (Castro, 2015) y *Heterorhabditoides* sp. (Castro, 2020).

Para un estudio con cepas nativas de NEPs, se deben realizar varias pruebas, ya que la información resultante es de suma importancia para conocerlos más a fondo e incluso para poder realizar estudios que nos ayuden a comparar la actividad de estas en condiciones de campo. Por lo tanto, el realizar producciones *in vivo* e *in vitro*, sería muy valioso para conocer desde el ciclo de vida de las especies nativas, hasta su capacidad reproductiva de las mismas y de este modo obtener resultados favorables para un control de plagas.

2.- ANTECEDENTES

2.1 Nemátodos entomopatógenos

Los NEPs son un grupo altamente diverso, ubicado dentro del Phylum Nematoda, son gusanos redondos de cuerpo alargado, cilíndrico y no segmentado; para crecer mudan la cutícula, tienen simetría bilateral; son organismos microscópicos (Stock y Goodrich, 2012).

La palabra entomopatógeno, tiene raíces griegas, se compone por: entomon (insecto) y pathos (padecer, enfermedad), y geno (engendrar, producir). Significa que causa enfermedad a los insectos. Los NEPs son empleados en control biológico, y se les denomina como endoparasitarios, y estos son capaces de ocasionar la muerte de un insecto eficientemente, lográndolo con ayuda de bacterias, las cuales, deben transmitirse de generación en generación (Dillman *et al.*, 2012).

2.2 Biología de los NEPs

Los NEPs pueden medir de 0.1 mm a 2 mm, y cuentan con un tracto alimentario, que consta de la boca, que se conecta con la cavidad bucal o estoma, el cual se une a su vez al tubo digestivo formado por el esófago, intestino, recto y terminando con el ano; no presentan sistema circulatorio ni respiratorio, pero cuentan con un sistema muscular y nervioso, (Stock y Goodrich, 2012) podemos observar las partes de NEPs machos y hembras en la figura 1 que se muestra a continuación.

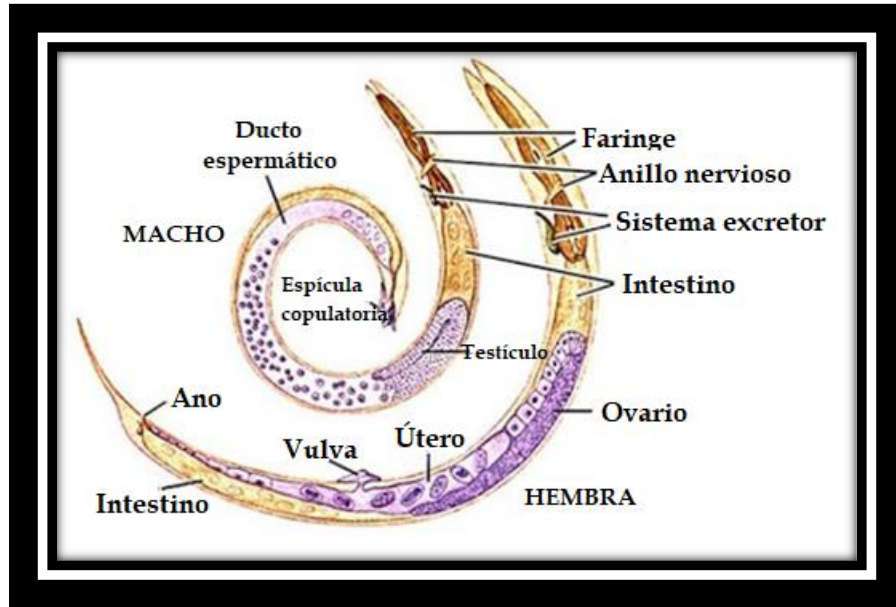


Fig. 1.- Partes de nemátodos entomopatógenos macho y hembra.

Los sexos generalmente están separados. El sistema reproductor en el caso de los machos se abre ventralmente en el recto formando una cloaca, tienen uno o dos testículos y una o dos espículas esclerotizadas que son usadas como estructuras copulatorias generalmente. En el caso de las hembras adultas, éstas tienen uno o dos ovarios con la vulva localizada ventralmente cerca de la región media del cuerpo (Stock y Goodrich, 2012).

Los NEPs viven parasitando varios insectos de importancia económica en la agricultura (Bathon, 1996). Esta última característica hace que estos organismos sean ideales para su uso en el Control Biológico (CB) (Picoaga *et al.*, 2007). Los NEPs son seguros para el ambiente y la salud humana por lo que son una herramienta útil en la regulación de poblaciones de insectos plaga (Poinar, 1989). Las etapas de vida de los NEPs (Fig. 1) son huevo, cuatro estadios juveniles (los estadios 1, 2 y 4 viven dentro del hospedero y el estadio 3 o juvenil infectivo o JI) y la etapa adulta (Picoaga *et al.*, 2007).

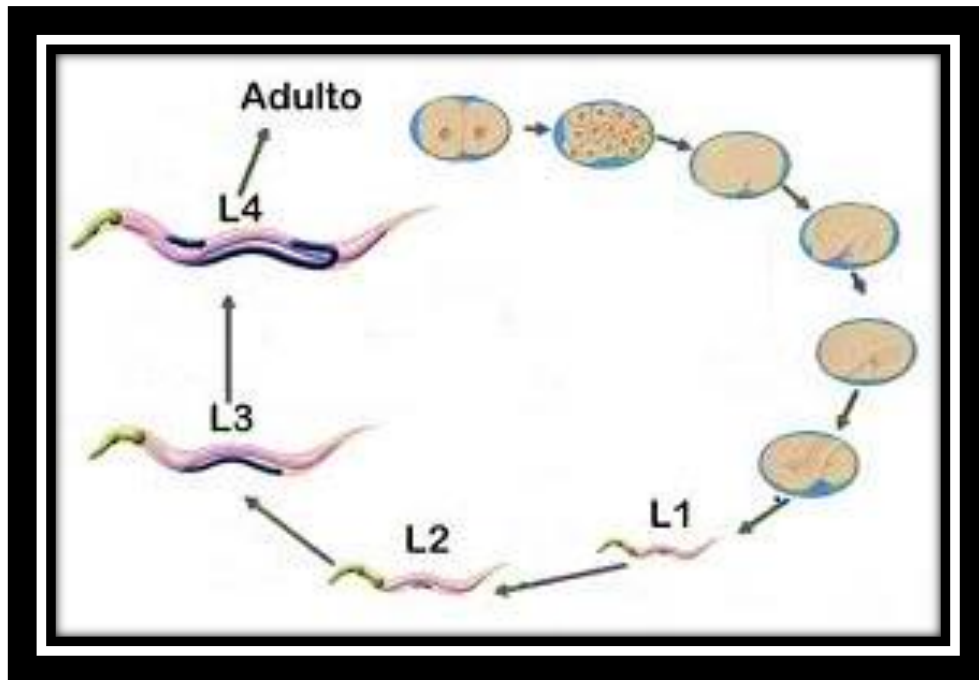


Fig. 2.- Etapas de vida de los nemátodos entomopatógenos.

Hay más de 3000 asociaciones simbióticas entre nemátodos e insectos (Poinar, 1979). Siendo principalmente parásitos obligados y facultativos, pueden atacar estadios biológicos de larva, pupa, prepupa e incluso adulto de insectos (Kaya y Hara, 1981).

2.3 Conducta de NEPs

Al buscar un hospedero, pueden existir limitaciones para el NEP, ya que existen barreras de comportamiento y ecológicas. Siendo de este modo, la distribución natural del hospedador, la más importante (Gaugler y Campbell, 1993). Cuentan además con métodos de búsqueda los cuales les ayudan a llegar a su hospedero (Lewis *et al.*, 1992; 1993). Siendo un factor importante para el rango de hospederos a los cuales afectan, la conducta es distinta en los JI. Sus estrategias se clasifican en emboscadores y cazadores.

Los emboscadores, actúan de una forma en la cual el NEP espera al insecto cerca o en la superficie del suelo, y su dispersión es limitada (Molyneux y Bedding, 1984; Alatorre-Rosas y Kaya, 1990).

Por otro lado, los cazadores son muy móviles, y buscan al insecto activamente, ya que responden a los productos de excreción que dejan los hospederos, como lo es, el dióxido de carbono (Lewis *et al.*, 1992, 1993), además, están adaptados para parasitar especies sedentarias y subterráneas (Gaugler y Campbell, 1993).

2.4 Clasificación de NEPs

Los nemátodos son metazoos y pertenecen al Phylum Nematoda, el cual es muy diverso (Adams *et al.*, 2006), a su vez pertenecen a la clase Sercementea y orden Rhabditida, dentro del cual, se encuentra la mayoría de nemátodos de vida libre, incluyendo a Steinernematidae y Heterorhabditidae (Smart y Nguyen, 1994).

Existen 30 familias que cuentan con potencial para ser utilizadas dentro del control biológico, las cuales pertenecen a cuatro órdenes: Mermithida, Tylenchida, Aphelenchida y Rhabditida. Siendo la última la mayormente estudiada, en la cual se han estudiado diversas familias como: Mermithidae, Tetradonematidae, Allantonematidae, Neotylenchidae, Sphaerulariidae, Aphelanchidae, Rabdithidae, Steinernematidae y Heterorhabditidae. (De Ley y Blaxter, 2002).

De las familias mencionadas, han sido mayormente estudiadas Steinernematidae y Heterorhabditidae, por lo tanto, existe más información de estas, así como de las especies descritas pertenecientes a estas dos. Además de estas familias mencionadas, se han reportado también especies de NEPs que pertenecen a la familia Rhabditidae (Zhang *et al.*, 2008; Abebe *et al.*, 2010, Torini *et al.*, 2015).

2.5 Ciclo de vida de NEPs

Los JI penetran en sus hospederos normalmente por los orificios naturales, es decir, por la boca, ano o espiráculos. Una vez que llegan a la hemolinfa del insecto, liberan sus bacterias que causan la muerte del insecto por septicemia en un periodo de aproximadamente 48 horas. Las bacterias se multiplican, y a su vez, producen condiciones que son favorables para la alimentación de los NEPs, los cuales requieren de la presencia de la bacteria simbiótica para reproducirse y completar su ciclo. Los NEPs se desarrollan hasta el estado de adultos y se reproducen dentro del cadáver. Al terminarse los nutrientes, el ciclo termina en el estadio JI, incorporan las bacterias y abandonan el cadáver buscando nuevos insectos hospederos (Fig. 2).

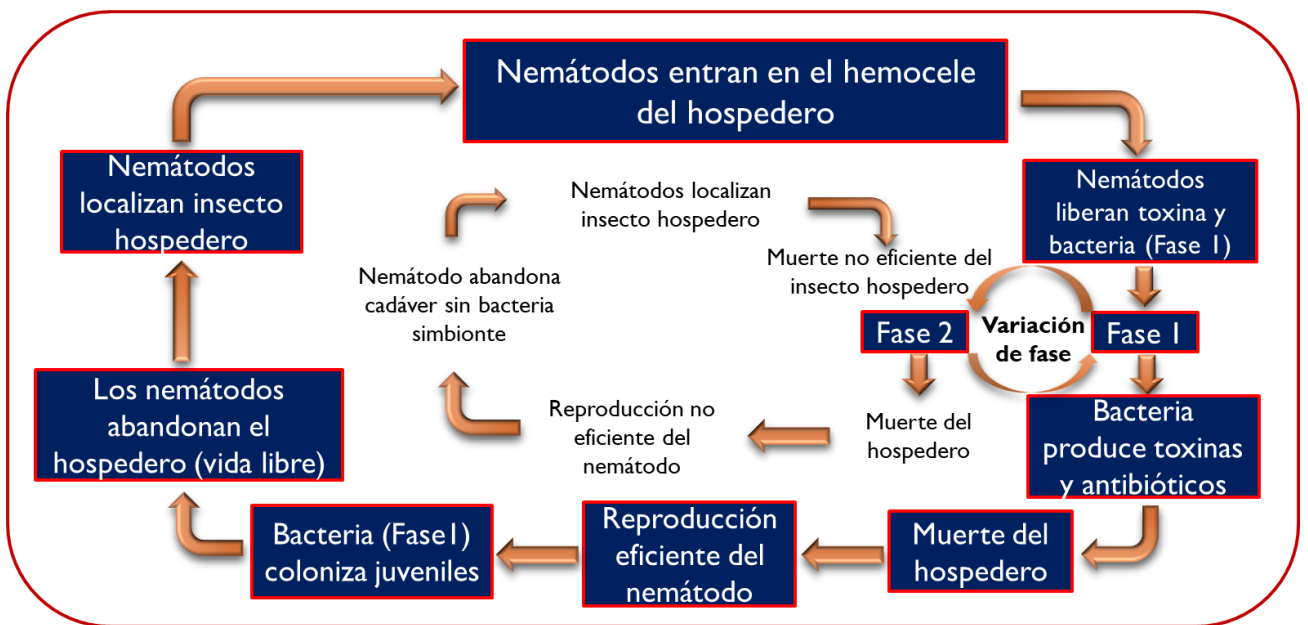


Fig. 3.- Simbiosis nemátodo-bacteria e interacción con el insecto hospedero, modificada de Cabello, 2006.

2.5.1 Ciclos de vida de Heterorhabdítidos y Steinernemátidos

Steinernema cuenta con un estadio de huevo, cuatro estadios juveniles y uno adulto, en el cual encontramos machos y hembras (Poinar, 1993). Dependiendo del tamaño del huésped, pueden producirse de una a dos generaciones del NEP (Smart y

Nguyen, 1994). El estadio infectivo, el cual es el tercero (JI), presenta doble cutícula, ya que conserva la del segundo estadio, y es la única fase que podemos encontrar en vida libre o fuera del insecto hospedero, hasta encontrar uno nuevo. En este estado, el NEP no se alimenta, ya que cuenta con boca y ano cerrados, y puede sobrevivir gracias a las reservas que acumula. Posteriormente, busca activamente a su nuevo hospedero para reproducirse, en esto intervienen estímulos químicos y físicos, los cuales los genera el insecto, como son: gradientes de temperatura, niveles de CO₂, los cuales provienen de su respiración, y otros productos de excreción. Enseguida el NEP entra a través de las aberturas naturales del insecto, como son, boca, ano y espiráculos, o bien, a través de partes suaves del tegumento, ya que los JI cuentan con un diente dorsal, con el cual son capaces de romper la cutícula y de este modo entrar directo al hemocele (Grewal *et al.*, 1997; Pye y Burman, 1981; Woodring y Kaya, 1988; Kaya y Koppenhofer, 1999).

Dentro del insecto, el JI entra en el hemocele del hospedero, liberando su bacteria simbiote, lo cual puede ocurrir a través del ano cuando hablamos de *Steinernema*, liberando a *Xenorhabdus* spp. (Thomas y Poinar, 1979) y por la boca si hablamos de *Heterorhabditis* spp. liberando a *Photorhabdus luminescens* (Boemare *et al.*, 1993) la cual se dirige a la hemolinfa del insecto. La bacteria se multiplica rápidamente y ocasiona de este modo la muerte del insecto por septicemia, se reporta que ocurre dentro de las 24 a 48 horas (Grewal, 2000). Debido a cómo actúan las enzimas proteolíticas liberadas por la bacteria, es producida la destrucción de las estructuras del interior del insecto, con lo cual se obtienen los nutrientes necesarios para que se pueda desarrollar el NEP (Akhurst, 1982).

Los JI se alimentan entonces de la bacteria y de los tejidos del hospedero, a continuación, mudan a la cuarta etapa y posteriormente a hembras y machos de primera generación (Smart, 1995). Los steinernemátidos, al penetrar al insecto y desarrollarse la primera generación se dan adultos de sexos separados, los cuales se reproducen a su vez dando lugar a una o más generaciones, y al terminarse los

recursos alimenticios, son producidos los JI para salir en busca de un nuevo hospedero. En el caso de los heterorhabdítidos, los JI de primera generación son hermafroditas, para posteriormente en la segunda generación desarrollarse machos y hembras diferenciados (Smart y Nguyen, 1994). En la segunda generación, los adultos copulan y producen huevos, que a su vez dan paso al primer estado juvenil, mudando al segundo, el cual aparece al terminarse recurso, y en los dos géneros, éste instar deja de comer y almacena a su bacteria simbiote ya sea en una vesícula especial o en el lumen. Al mudar al JI o tercer instar, el NEP retiene la cutícula del instar anterior, y abandonan el cadáver en busca de un nuevo hospedero (Campbell y Gaugler, 1991).

2.6 Bacterias simbiotes

Existe una variedad de bacterias simbiotes, asociadas a los NEPS. Los pertenecientes a la familia Steinernematidae se asocian con la especie *Xenorhabdus*, y los de la familia Heterorhabditidae, con la bacteria *Photorhabdus* que a su vez cuenta con distintas especies.

2.6.1 *Xenorhabdus*

Se han encontrado 16 especies del género *Steinernema* con asociación mutualista del género *Xenorhabdus*, pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, a continuación, se muestran algunas de las asociaciones en el cuadro 1:

Especies de NEPs	Especies de bacterias simbiotes
<i>Steinernema carpocapsae</i>	<i>Xenorhabdus nematophilus</i>
<i>S. feltiae</i>	<i>X. bovienii</i>
<i>S. kushidai</i>	<i>X. japonicus</i>

Cuadro 1: Especies de NEPs pertenecientes al género *Steinernema* y su respectiva bacteria simbiote.

Las especies de este género son bacilos Gram negativos, anaerobias facultativas y pertenecen a la familia Enterobacteriaceae. En estas bacterias, se produce dimorfismo, llamados fase 1 (primaria) y fase 2 (secundaria), las cuales tienen características específicas, y la fase 1 produce antibióticos (Akhurst, 1980; McInerney *et al.*, 1991).

Las células de la fase 1 de *Xenorhabdus* son las asociadas a la producción de NEPs, éstas son más grandes que las de fase 2, tienen cuerpos de inclusión cristalino, son móviles y producen proteasas, lipasas y otros compuestos bioactivos (Akhurst, 1982; Boemare y Akhurst, 1988). Estas fases pueden distinguirse utilizando la tinción con azul de bromotimol y cloruro de trifeniltetrazolio, las células de fase 1 sembradas en los medios de crecimiento con los colorantes, forman colonias azules con un núcleo rojo (Kaya y Stock, 1997).

S. carpocapsae tiene asociación mutualista con la bacteria *X. nematophila*. Durante su ciclo de vida, la bacteria se encuentra en el receptáculo, la cual es una región especial en el intestino del NEP. El JI libera las bacterias en el hemocele del hospedero, reduciendo de este modo las defensas de este, y suprimiendo el sistema inmune y a su vez matarlo (Dunphy y Webster, 1984; Snyder *et al.*, 2007).

La proteína UnA, la cual es producida por algunas cepas de *X. nematophila*, y evita que los hemocitos del insecto formen cápsulas o nódulos los cuales normalmente rodearían a los NEPs y bacterias (Ribeiro *et al.*, 1999). Las proteínas de la membrana externa y lipopolisacáridos que son producidos por *X. nematophila* evitan que se adhieran los hemocitos del insecto, inhibiendo así la activación de la fenoloxidasa, la cual es una enzima importante para la respuesta inmune de insectos (Dunphy y Webster, 1991; Forst *et al.*, 1997). Ciertas cepas de esta bacteria inhiben la actividad de la fosfolipasa A₂ (PLA₂), la cual es responsable de una parte de la biosíntesis de eicosanoides (Dunphy y Webster, 1991; Park y Kim, 2000, 2003), y la ausencia de eicosanoides produce una depresión inmunitaria severa, causando septicemia. Lo cual a su vez conduce a una producción en exceso de quinonas, las cuales son tóxicas

para las larvas. Las especies *X. nematophila*, *X. japónica*, *X. kozodoii* y *X. beddingii* son capaces de causar apoptosis de hemocitos de los insectos (Dunphy y Webster, 1984; Brillard *et al.*, 2001; Cho y Kim, 2004). En *X. nematophila*, se ha identificado que el compuesto responsable de la citotoxicidad es la proteína CyA. Estas toxinas y exoenzimas se producen en horas, y de este modo, el insecto muere dentro de las 24 a 48 horas (Khush y Lemaitre, 2000). Al agotarse nutrientes los JI se vuelven a asociar a la bacteria y abandonan el cadáver en busca de un nuevo hospedero. Otros estudios han demostrado también que el ADN genómico de *Xenorhabdus* contiene muchos genes, los cuales están involucrados en la síntesis de compuestos insecticidas y antimicrobianos (Ogier *et al.*, 2010; Chaston *et al.*, 2011).

2.6.2 *Photorhabdus*

Photorhabdus es un género compuesto de tres especies: *P. luminiscens*, *P. temperata* y *P. asymbiotica* (Joyce *et al.*, 2006). En el caso de *P. luminiscens* y *P. temperata*, se ha encontrado que establecen simbiosis obligada con NEPS de la familia Heterorhabditidae (Hinchliffe *et al.*, 2010; Rodou *et al.*, 2010).

Las células de esta bacteria son bacilos no formadores de esporas, Gram negativos y móviles con flagelos peritricos, además son anaerobios facultativos y su temperatura óptima se encuentra entre los 37 a 38 °C.

En el cuadro 2, se muestran algunas especies de NEPs pertenecientes al género *Heterorhabditis*, con su respectiva bacteria simbiote:

Especies de NEPs	Especies de bacterias simbiotes
<i>Heterorhabditis amazonensis</i>	No se conoce
<i>H. bacteriophora</i>	<i>Photorhabdus luminescens</i> sub. <i>Kayaii</i> <i>P. luminescens</i> sub. <i>laumondii</i> , <i>P. luminescens</i> sub. <i>caribbeanensis</i> , <i>P. temperata</i> sub. <i>khanii</i> , <i>P. temperata</i> sub. <i>thracensis</i>
<i>H. baujardi</i>	No se conoce
<i>H. brevicaudis</i>	No se conoce
<i>H. downesi</i>	<i>P. temperata</i>
<i>H. floridensis</i>	No se conoce
<i>H. georgiana</i>	<i>P. luminescens</i> sub. <i>akhurstii</i>
<i>H. gerrardi</i>	<i>P. asymbiotica</i> <i>kingscliffe</i>
<i>H. indica</i>	<i>P. luminescens</i> sub. <i>akhurstii</i>
<i>H. marelatus</i>	No se conoce
<i>H. megidis</i>	<i>P. temperata</i> sub. <i>cinérea</i>
<i>H. mexicana</i>	No se conoce
<i>H. poinari</i>	No se conoce
<i>H. safricana</i>	No se conoce
<i>H. sonorensis</i>	No se conoce
<i>H. taysearae</i>	No se conoce
<i>H. zealandica</i>	<i>P. temperata</i> sub. <i>tasmaniensis</i>

Cuadro 2: Especies de NEPs pertenecientes al género *Heterorhabditis* y su respectiva bacteria simbiote.

Photorhabdus luminescens es una bacteria bioluminiscente nemátodo-simbiótica, es gram negativa y pertenece a la familia de las Enterobacterias (Rodou *et al.*, 2010). Al igual que otros géneros de simbiotes de NEPs, esta bacteria presenta variación fenotípica. La fase 1 se ha aislado de JI e insectos con infecciones tempranas, por otra parte, la fase 2 puede encontrarse en las últimas etapas del desarrollo de los NEPs

tanto en cadáveres de insectos como en cultivos de la fase 1 (Akhurst, 1980). Las células de la fase 2, son de un tamaño más pequeño, y las colonias tienen una morfología distinta, además no cuenta con las distintas proteínas y metabolitos secundarios que la primera (Boemare y Akhurst, 1988), ya que la variante fenotípica llamada fase 1 o variante primaria produce colorantes, antibióticos, lipasas, proteasas y bioluminiscencia, por otro lado, la fase 2 o variante secundaria carece o tiene niveles reducidos de las propiedades de la variante 1, pero ambas variantes muestran patogenicidad (Rodou *et al.*, 2010).

Físicamente, las bacterias en fase 1, se caracterizan por producir un pigmento rojo y las colonias pueden absorber el rojo o azul de bromotiol del agar McConkey y del NBTA. Las colonias en fase 2 son color amarillo y no absorben los colorantes de los medios (Akhurst, 1980). Esta bacteria coloniza el intestino de los JI, y éstos invaden larvas de insectos susceptibles, una vez dentro libera la bacteria (por regurgitación) y llega al hemocele del insecto, inhibe la inmunidad de éste y prolifera rápido, matando al hospedero en 2 días aproximadamente. La bacteria produce una serie de toxinas que están involucradas en la patogenicidad que generan contra los hospederos (Joyce *et al.*, 2006) y uno de los principales complejos de toxinas de *P. luminescens* es el Tc, el cual se compone por tres tipos de componentes: TcA, TcB y TcC (Bowen *et al.*, 1998; Waterfield *et al.*, 2001). Estudios han demostrado que la actividad biológica se encuentra en los componentes TccC3 y TccC5, dichos componentes inhiben las reacciones de defensa de las células inmunes, como lo es la fagocitosis de bacterias (Lang *et al.*, 2010). La bacteria *P. lumeniscens* debe además ser capaz de producir antibióticos y enzimas extracelulares que matan los insectos (Guerra *et al.*, 2014).

2.6.3 *Serratia* spp.

La asociación de *Serratia* spp. Con NEPs está bien documentado, y distintas especies del género producen varios factores de virulencia (Castagnola y Stock, 2014).

Serratia marcescens es una bacteria gram negativa, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae (Freeman, 1985), puede vivir en distintos tipos de ambiente, con o sin oxígeno, es decir, es una bacteria anaerobia facultativa. Algo particular de la bacteria, es la producción de un pigmento rojo, llamado prodigiosina, el cual es un compuesto que es derivado del pirrol (Steiner *et al.*, 1994). Además de la prodigiosina, esta bacteria produce lecitinasas, fosforilasas, toxinas extracelulares y quitinasas (Escobar *et al.*, 2001).

S. marcescens es cosmopolita, se ha encontrado en hongos Basidiomicetos y Ascomicetos (Ordentlich, *et al.*, 1988), caracoles, insectos, vertebrados semillas de frijol y crustáceos, suelo, agua y plantas (Escobar *et al.*, 2001).

Cuando infecta a un insecto, puede morir en un lapso de uno a tres días y proporciona a menudo, un tono rojo en los cadáveres (Boucias, 1998).

La quitina es un polímero renovable, ocupa en la naturaleza el segundo lugar en abundancia, en primer lugar, está la celulosa. Puede encontrarse en protozoarios, crustáceos, insectos y hongos. Está formada por N-acetilglucosamina (NAG), y se unen por un enlace glicosídico β -1,4. Las quitinasas (Chi) son enzimas que hidrolizan la quitina en el enlace glicosídico.

Tiene un sistema quitinolítico completo formado por tres clases de enzimas, que son: endoquitinasas, exoquitinasas y quitobiasas, así como una proteína que se une a quitina (Brurberg *et al.*, 1996).

Serratia marcescens es una de las bacterias con mayor capacidad quitinolítica conocidas hasta ahora.

Endoquitinasas: hidrolizan la quitina en los enlaces glicosídicos internos, y libera principalmente quitobiosa (dímero de NAG) y cantidades pequeñas de otros oligosacáridos superiores.

Exoquitinasas: entre ellas se encuentran las quitobiosidasas, las cuales catalizan la liberación de quitobiosa a partir del extremo no reductor de la quitina; y las N-acetilglucosaminidasas que liberan NAG a partir del extremo no reductor.

Quitobiasas: actúan sobre la quitobiosa y producen monómeros de NAG (Barboza-Corona, *et al.*, 1998).

En la figura 3, se muestra el sistema quitinolítico de *S. marcescens*, en el cual, la quitina que está en el medio es degradada por la endoquitinasa ChiA, la cual es secretada por la bacteria. Rompe los enlaces internos β -1,4 de la quitina y se forman oligómeros de N-acetilglucosamina, y éstos pasan al espacio periplásmico con la ayuda de la proteína porina la cual se encuentra en la pared celular de *S. marcescens*. Los oligómeros son degradados por ChiB, la cual es una quitobiosidasa y cataliza la formación de la quitobiosa. A continuación, la quitobiosa se hidroliza por quitobiasas formando monómeros de N-acetilglucosamina al citoplasma, siendo ahí utilizadas como fuentes de carbono y nitrógeno (Brurberg *et al.*, 1996).

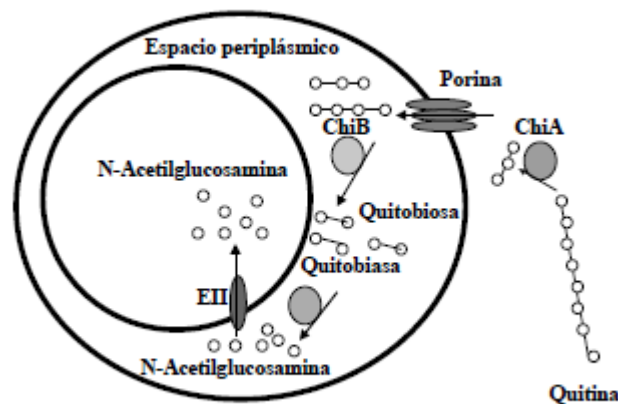


Fig. 4.- Sistema quitinolítico de *S. marcescens*.

En el caso de *Serratia entomophila*, se sabe que produce proteínas Sep (SepA, SepB y SepC), las cuales son un grupo de toxinas insecticidas similares a las toxinas insecticidas de *P. luminescens* (Hurst, *et al.*, 2000).

Además, con la secuenciación de *Serratia nematodiphila* se han destacado otros factores patogénicos de las especies de *Serratia*. Encontrando varias enzimas extracelulares secretadas, tales como lipasas, proteasas y quitinasas (Kwak *et al.*, 2015).

Se encontró también, que la patogenicidad de *S. marcescens* se incrementa por una metaloproteasa (serralisina) que secreta y la bacteria entonces, es capaz de suprimir la inmunidad celular disminuyendo las propiedades adhesivas de las células inmunes del insecto (Ishii *et al.*, 2014).

2.7 Especies de NEPs nativas

Actualmente se busca utilizar especies nativas de NEP de las zonas geográficas donde se desea aplicar el biocontrol (Campos-Herrera *et al.*, 2007); el uso de especies nativas de NEPs resulta más eficaz que el uso de especies exógenas debido a que de las especies nativas se espera que ya estén adaptadas a las condiciones ambientales de esa región particular y, por lo tanto, su aplicación debería ser exitosa para el control de plagas. Sin embargo, en la práctica no es sencillo usar de forma extensiva en un aislado porque no existen sistemas unitarios de producción a gran escala, sino que cada especie requiere de condiciones particulares de crecimiento en los contenedores de producción.

2.7.1 Cepas de NEPs nativas del estado de Morelos

El laboratorio de Control biológico del CEIB de la UAEM cuenta con tres cepas de NEPs: DS, MC5 y XRPC4. La cepa MC5 se aisló del suelo de la localidad de Tepalcingo, la cepa DS se aisló directamente de una larva muerta de *Diatraea magnifactella* en campo (Castro, 2015) y la cepa XRPC4 se aisló en Xochitepec (Castro, 2018). Estas especies se identificaron previamente realizando técnicas morfométricas, morfológicas y moleculares (Castro, 2015). La cepa DS tuvo identidad con *Caenorhabditis brenneri*, la cepa MC5 mostró identidad con *Oscheius myriophila* (Castro, 2015) y la cepa XRPC4 con *Heterorhabditoides* sp. (Castro, 2020). Se realizaron pruebas de patogenicidad y virulencia de las cepas con anterioridad, y se registraron los siguientes resultados:

- La cepa DS tuvo una CL₅₀ de 16 JI sobre larvas de *Diatraea magnifactella*
- La cepa MC5 tuvo una CL₅₀ de 21 JI sobre larvas de *D. magnifactella* (Castro, 2015).
- La cepa XRPC4 tuvo una CL₅₀ de 12 JI sobre larvas de *G. mellonella* y de 25 JI en larvas de *Tenebrio molitor* (Castro, 2020).

Cuadro 3.- Cepas de nemátodos entomopatógenos del cepario de Control Biológico.

Cepa	Especie	Hábitat	Hospedero	Bacteria simbiote	Distribución geográfica	Referencias
DS	<i>Caenorhabditis brenneri</i>	_____	Larva de <i>Diatraea magnifactella</i>	<i>Serratia</i>	Costa Rica, Trinidad, Guadalupe, Bangalore, Penang, Sumatra, Bali.	W. Sudhaus & K. Kiontke
MC5	<i>Oscheius myriophila</i>	Suelo de caña de azúcar en Tepalcingo	_____	<i>Serratia</i>	EUA, China, Tasmania, Ceres (Sudáfrica).	Balakrishnan <i>et al.</i>
XRPC4	<i>Heterorhabditoides</i> sp.	Suelo de caña de azúcar de Xochitepec	_____	<i>Serratia</i> (Probablemente)	Libano	E. Noujeim, <i>et al.</i>

2.8 Producción de NEPs

El estudio a nivel de campo y el desarrollo de productos comerciales de nemátodos ha sido realizado sólo en las últimas décadas, para lo cual se han utilizado dos métodos: producción *in vivo* e *in vitro*.

2.8.1 Producción de NEPs *in vivo*

La producción *in vivo* es un proceso simple en el cual se utilizan insectos hospederos vivos, teniendo diversas ventajas como: costos bajos para poner en marcha, muy poco uso de tecnología y es uno de los más importantes por el hecho de que se obtienen NEP de alta calidad como resultado del proceso; se utiliza como hospedero sustituto por lo regular *Galleria mellonella* (Shapiro-Ilan *et al.*, 2004), la cual es producida comercialmente en grandes cantidades en varios países, y es susceptible a la mayoría de especies de nemátodos (Sáenz, 2005). Su desventaja es una eficiencia baja ya que este método es ideal si se utiliza para la producción a escala laboratorio, así como también para las pequeñas cooperativas de productores (Gaugler *et al.*, 2000).

2.8.2 Producción de NEPs *in vitro*

Por otro lado, para la producción de NEPs a gran escala y menor costo existen métodos *in vitro* alternativos, como son el medio de cultivo sólido y el medio de cultivo líquido. El método de cultivo sólido ha ido modificándose, en un inicio se utilizaron arenas de dos dimensiones, como cajas Petri con medios de cultivo basados en comida (como riñones de cerdo, alimento para perro y otros productos animales) (Hara *et al.*, 1981), para después utilizarse un medio mejorado que incluía extracto de levadura, caldo nutritivo, aceite vegetal y harina de soja. En la actualidad se ha inventado un sistema de tres dimensiones, que implica el cultivo de nemátodos en espuma de poliuretano (Bedding, 1981).

2.9 Pruebas de producción *in vivo*

Se hicieron estudios con el NEP *C. brenneri*, el cual ha sido cultivado *in vivo* utilizando como insecto huésped a *G. mellonella*, obteniendo 15 000 JI por cada larva de *G. mellonella* usada, sin embargo, esta producción de JI es baja comparada con la producción de otras especies de NEPs donde se han obtenido de 30 000 a 240 000 JI (Guadarrama, 2018) por lo cual, es necesario desarrollar técnicas de cultivo más productivas.

En este trabajo abordaremos estrategias de cultivo *in vivo* utilizando larvas de *G. mellonella*, *Tenebrio molitor* y *Spodoptera frugiperda*; e *in vitro*, para lo cual es indispensable tener la mayor información posible al respecto, siendo el ciclo de vida de los NEPs importante para lograr tal objetivo, ya que los reportados son para los NEPs de las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae. Al lograrse una producción tanto *in vivo* como *in vitro* adecuadas, se busca poder realizar pruebas en campo, para tener más información de estas especies nativas del estado de Morelos.

3.- JUSTIFICACIÓN

Los NEPs son una alternativa prometedora para el control de insectos plaga, ya que han demostrado tener resultados favorables frente a varios de ellos en campo, y si bien, hay información importante ya reportada, ésta se centra en NEPs de las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae principalmente.

En el Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB), específicamente, en el laboratorio de Control Biológico, se han realizado aislados de NEPs en diferentes partes del estado de Morelos, y se han investigado principalmente 3 cepas identificadas como: DS, MC5 y XRPC4. Dichas cepas, han sido identificadas concluyendo que se tratan de las especies de NEPs: *C. brenneri*, *O. myriophila* y *Heterorhabditoides* sp. respectivamente, y su uso puede ser más prometedor incluso que las especies comerciales. Para esto es importante complementar información básica de estas cepas, para conocer características sobre su ciclo de vida, reproducción *in vivo* e *in vitro*, así como virulencia y patogenicidad sobre diferentes especies de insectos.

4.- HIPÓTESIS

Los nemátodos *C. brenneri*, *O. myriophyla* y *Heterorhabditoides* sp. nativos del estado de Morelos y reportados como entomopatógenos, tendrán al menos dos generaciones en el interior de larvas de *G. mellonella*, y será posible llevar a cabo su reproducción *in vivo* e *in vitro*.

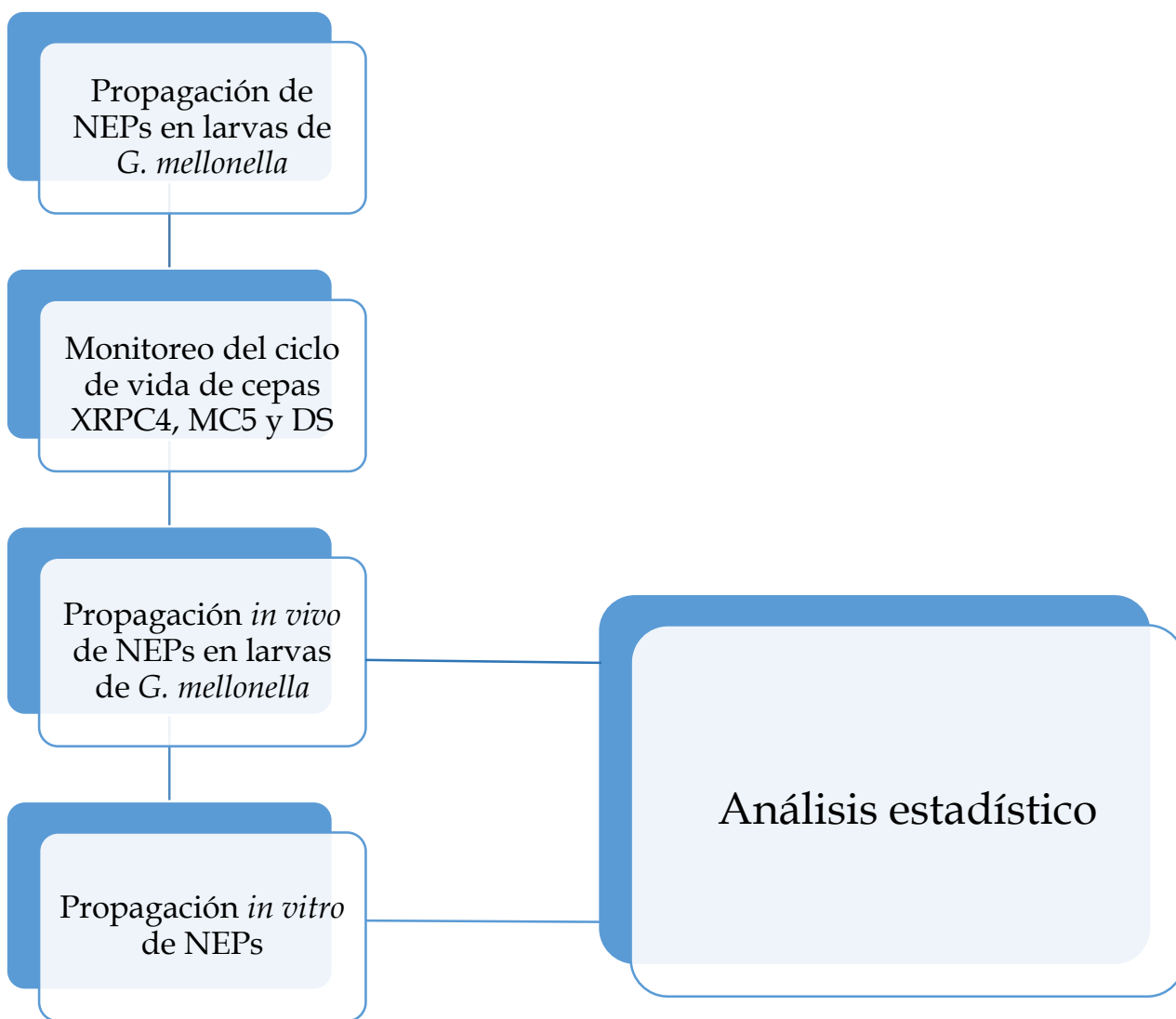
5.- OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el ciclo de vida *in vivo* de las especies *C. brenneri*, *O. miriophyla* y *Heterorhabditoides* sp. de nemátodos entomopatógenos y lograr reproducirlos *in vivo* e *in vitro*.

6.- OBJETIVOS PARTICULARES

- Describir el ciclo de vida de las tres especies de nemátodos entomopatógenos *C. brenneri*, *O. miriophyla* y *Heterorhabditoides* sp. utilizando larvas de *G. mellonella*.
- Determinar el efecto de la concentración inicial sobre la producción de juveniles infectivos.
- Conocer el efecto de la temperatura sobre la reproducción *in vivo* en *G. mellonella* de los NEPs.
- Propagar NEPs en larvas de *G. mellonella*.
- Producir nemátodos entomopatógenos *in vitro* utilizando diferentes medios de cultivo.

7.- MATERIALES Y MÉTODOS



7.1 *Galleria mellonella*

Con el fin de contar en todo momento con el material necesario, se cuenta en el laboratorio de Control Biológico con la cría de *G. mellonella*, la cual se mantiene en botes de plástico de capacidad de 1 litro a aproximadamente 28 °C. Para su cuidado, es importante alimentarlos con una dieta especial (Anexo 2).

7.2 Propagación de NEPs

Para la propagación de NEPs son empleadas larvas de *G. mellonella* de la cría establecida en el laboratorio de Control biológico del Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB). Se realiza la correspondiente propagación, de la especie de NEP según se vaya requiriendo, cabe destacar que en el presente trabajo se utilizan 3 diferentes cepas de NEPs, siendo éstas: XRPC4, MC5 y DS.

En el fondo de las cajas de Petri de 90x15 mm se colocó un disco de papel filtro de poro mediano, después se colocaron cinco larvas por caja y se añadieron 100 µL de suspensión con NEPs por larva; al término de 10 días aproximadamente las larvas están listas para pasarse a trampas White, que consisten en cajas de Petri con las larvas muertas que deben pasar previamente por cloro al 5% y tres veces por agua destilada estéril (Castillo *et al.*, 2011).

Una vez que los NEPs se reproducen y desarrollan nuevas generaciones de JI, éstos son depositados en frascos de cultivo Corning de 50 mL, con 20 mL de agua destilada estéril y conservados bajo condiciones de refrigeración a 12 ± 1 °C (Woodring y Kaya, 1988).

Para la cuantificación de JI se utiliza el método propuesto por Woodring y Kaya (1988). Para esto se homogeniza la suspensión inicial contenida en los frascos Corning para posteriormente tomar 100 µl, los cuales se depositan en una caja de Petri. Posteriormente, se realiza el conteo de los JI vivos en un microscopio

estereoscópico. Esto se debe repetir cinco veces y se calcula el promedio de los conteos para conocer de este modo la concentración de las suspensiones de NEPs.

Con la fórmula de Woodring y Kaya (1988), se obtienen las diluciones requeridas para utilizar en cada una de las evaluaciones:

$$A = \frac{D \times C}{B}$$

Dónde:

A = Volumen de la suspensión concentrada a ser diluida.

B = Número de nemátodos/mL en la suspensión diluida.

C = Volumen final en mililitros de la nueva dilución.

D = Concentración de nemátodos deseada en la nueva dilución.

(Woodring y Kaya, 1988).

7.3 Descripción del ciclo de vida

7.3.1 Infección de *G. mellonella*

Para establecer el ciclo de vida general y confirmar la presencia de un ciclo de dos o tres generaciones, se utilizaron 23 cajas de Petri de 60x15 mm con papel filtro en el fondo previamente humedecido con 400 µL de agua destilada estéril, agregando a cada caja de Petri 5 larvas de *G. mellonella* y 200 JI de cada especie de NEP por larva, se manejaron cuatro temperaturas: 10 °C, 24 °C, 27 °C y 30 °C inicialmente, para posteriormente enfocarnos en la de 27 °C para las 3 especies de NEPs, iniciando el monitoreo a partir de las 8 horas de la infección con NEPs, después a las 12 horas y así cada 24 horas durante 20 días (Sáenz y López, 2011).

7.3.2 Fijación de NEPs

Se tomó una caja de Petri en el horario establecido, siendo el mismo para las tres especies evaluadas, se disectaron 5 larvas expuestas a NEPs en cajas de Petri de 90x15 mm, siendo previamente desinfectadas con cloro al 5% y agua destilada estéril, posteriormente, los NEPs obtenidos fueron fijados con formol salino al 4% a punto de ebullición para después montarlos individualmente en un portaobjetos agregando glicerina 1/20. Se tomaron 10 hembras y 10 machos, o bien JIs, que se fueron obteniendo por cada caja de Petri (Maldonado, G. S., & PE209106, P., 2009).

7.3.3 Aclaramiento de los NEPs

Para observar a detalle los NEPs obtenidos es conveniente transparentarlos después de fijarlos, para lo cual se utilizó glicerina y agua a diferentes concentraciones: 1/20, 1/15, 1/10, 1/5 y 1/1.

Para esto se van agregando las diferentes concentraciones a los portaobjetos, los cuales son colocados en una placa de calentamiento, este proceso puede durar hasta 8 horas por muestra aproximadamente (Caspeta, 2010).

7.3.4 Parámetros evaluados en los NEPs

Una vez que se obtuvieron los NEPs fijados y aclarados, se observaron en el microscopio óptico, y se buscaron las características mencionadas a continuación:

J4: Inicia con el desprendimiento anterior de la cutícula, posteriormente, ésta se rompe y el NEP sale. El ancho del cuerpo de los J4 incrementa a mayor velocidad que la longitud, alcanzando un ancho y largo similar al del adulto, se empieza a formar el sistema reproductor.

Adultos: El J4 muda formando la primera generación de adultos, los cuales se caracterizan por tener órganos reproductivos visibles, vulva en el caso de hembras y espícula en los machos. Los machos son generalmente más pequeños que las hembras.

J1: Son transparentes y se mueven lentamente.

J2: Son parcialmente transparentes por la acumulación de nutrientes almacenados.

J3: Tiene una doble cutícula, ya que retiene la del estadio anterior y le sirve como protección.

Generalmente la segunda generación de hembras y machos son de menor tamaño que la primera (Sáenz y López, 2011).

7.4 Propagación *in vivo*

Se utilizaron larvas de *G. mellonella* para la propagación de NEPs. Éstas fueron pesadas para comprobar que su peso sea similar. Una vez que se pesaron las larvas de *G. mellonella*, se colocaron en filtro en una caja Petri de 60x15 mm, añadiendo una larva por caja e infectando con 100, 500 y 1000 JI (unidad experimental) de las tres diferentes especies evaluadas, se colocaron en trampas White a los 4 días de su infección y se mantuvieron a 27 °C en una incubadora (Woodring y Kaya, 1988).

Se utilizaron 5 larvas por tratamiento, con sus respectivas 5 repeticiones, y se realizaron conteos de NEPs cada 48 horas durante 37 días, la evaluación fue acumulativa, es decir, se fue colectando el agua de las trampas White para llenarlas nuevamente con agua estéril limpia, la cual fue el medio para ir realizando el conteo de JIs obtenidos a lo largo del experimento.

7.4.1 Análisis estadístico

Los datos fueron transformados y posteriormente, se procesaron los resultados con un análisis de varianza y una comparación múltiple de medias Tukey utilizando el paquete estadístico SAS 9.1.

7.5 Propagación *in vitro*

7.5.1 Medio sólido bidimensional

La bacteria fue criopreservada inicialmente, de este modo puede ser inoculada a un medio sólido, del mismo modo los NEPs deben desinfectarse superficialmente.

Se utilizó:

Agar Luria Bertani:

- 5 gramos de extracto de levadura
- 10 gramos de peptona
- 10 gramos de NaCl
- 12 gramos de agar

Se colocaron los NEPs obtenidos de trampas White en un tubo de centrifuga de 1.5 mL. Se tomaron 100 μ L de la solución stock y se colocaron en una caja de Petri formando varias gotas. Con ayuda de un estereoscopio se contaron los NEPs en cada gota y esto se repitió 5 veces, para saber la concentración en los 100 μ L evaluados de la solución madre. Se colocaron los tubos Eppendorff de 1.5 mL en una microcentrifuga por 7 minutos a 2500 rpm. Los NEPs se concentrarán en el fondo del tubo, y de este modo se retiró el sobrenadante y se colocó 1 mL de solución de cloro 0.5% Después de esto se colocó nuevamente en la microcentrifuga a 2500 rpm por 7 minutos, se quitó nuevamente el sobrenadante y se enjuagó con 1 mL de agua destilada estéril, repitiendo 2 veces. Los NEPs obtenidos de esta sanitización superficial se inocularon al medio sólido.

Estos NEPs desinfectados se añadieron al medio sólido 24 horas después de la bacteria y se mantuvieron en incubación durante 5 días a 27 °C (Cocom, 2014).

8.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los intervalos de temperatura tanto para la supervivencia, infección y desarrollo de NEPs varían dependiendo la especie (Fernández *et al.*, Saunders y Webster, 1999). El ciclo de vida de NEPs y su producción *in vivo*, ha sido estudiado bajo diferentes condiciones de temperatura principalmente, así como también se ha demostrado que, la humedad es otro factor importante para la supervivencia e infectividad del NEP, ya que necesitan de una película de agua a su alrededor para el movimiento y la infectividad (Grant y Villani, 2003; Koppenhöfer y Fuzy, 2007; Morton, 2009).

En el presente trabajo se evaluaron distintas temperaturas, pero presentamos resultados obtenidos con la de 27 °C, que fue la más favorable para las especies estudiadas, y a continuación se presentan los referentes al ciclo de vida y propagación de cada una de ellas.

8.1 Ciclo de vida de *Heterorhabditoides sp.*

Para monitorear el ciclo de vida del NEP *Heterorhabditoides sp.* (cepa XRPC4), se utilizaron 10 JIs y se mantuvieron a una temperatura de 10 °C inicialmente, temperatura a la cual las larvas de *G. mellonella* tardaron un mayor tiempo en ser infectadas, algunas incluso al día 15 aún seguían vivas.

Esto podría deberse a la temperatura y a la cantidad de JIs que fueron utilizados, ya que la CL₅₀ de esta cepa es de 12 JI por larva de *G. mellonella* (Castro, 2020). Además, Castro en el 2020, realizó un monitoreo de ciclo biológico en el cuál observó hembras, machos y JI a la temperatura de 25 °C, y únicamente a esta temperatura pudo observar NEPs machos, esto a partir del día 20 después de la infección, entonces, la

temperatura es un factor importante para el desarrollo del NEP así como también el número de JI iniciales para infectar las larvas de *G. mellonella*.

Posteriormente, se decidió utilizar 200 JIs por cada larva de *G. mellonella* para mantener el experimento a una temperatura de 27 °C.

Se decidió realizar con esta cantidad inicial, por los resultados que se fueron presentando con las distintas cantidades utilizadas anteriormente, además, Sáenz y Luque en el 2000, realizaron un monitoreo de *Steinernema feltiae* Filipjev utilizando larvas de *G. mellonella*, utilizando 50 larvas de *G. mellonella* expuestas a 8000 JI en cajas Petri de 100 x 15 mm, a una temperatura de 20 °C. Para establecer que tanto influía la temperatura, Sáenz y Luque expusieron los JI a temperaturas de 10; 15; 20; 24; 30; 33; 35 y 37 °C y después de 2 días, se disectaron larvas diariamente hasta observar completo el ciclo de vida, asimismo observaron que la temperatura también influye en la relación de sexos de la primera generación de adultos, para lo cual utilizaron las temperaturas de 15, 24 y 30 °C. Con base a estos resultados, determinaron que las temperaturas óptimas fueron 15, 20 y 24 °C, ya que en ellas se pudieron observar ambas generaciones del ciclo de vida.

Por lo tanto, esta información fue importante para continuar con esta parte del proyecto, la cual nos indicó que, de acuerdo a la información revisada en otros trabajos, la temperatura es una variable de suma importancia, por lo cual, establecer esta información es un paso de gran peso en la presente investigación. Estableciendo que la temperatura de 27 °C fue la óptima para esta especie de NEP, y fue la utilizada para las demás de igual forma, mostrando los resultados a continuación (Cuadro 4):

Cuadro 4.- Los resultados del desarrollo de *Heterorhabditoides* sp., donde se determinaron las medidas de largo y ancho en las diferentes etapas de desarrollo (media \pm DE) y se observó la n respectiva en cada caso (N/V: no aplica).

Horas	Etapa	Promedio \pm D.E.		n
		Largo (μm)	Ancho (μm)	
8	NA	NA	NA	NA
12	NA	NA	NA	NA
24	NA	NA	NA	NA
48	NA	NA	NA	NA
72	J3	585 \pm 32.73	36.42 \pm 2.11	7
	J4	737.5 \pm 19.36	58.75 \pm 1.93	4
96	Hembra	1016.66 \pm 44.72	66.66 \pm 5.47	10
120	J4	737.5 \pm 85.87	55 \pm 9.48	4
	Hembra	1130 \pm 74.16	79 \pm 4.47	5
144	Hembra	1062.5 \pm 107.36	76.87 \pm 7.43	8
	Macho	880 \pm 174.64	56.25 \pm 1.93	4
168	J2	400 \pm 0	25 \pm 0	1
	J3	620 \pm 22.36	37 \pm 2.23	5
	J4	700 \pm 0	45 \pm 0	1
	Hembra	1140 \pm 127.14	74 \pm 9.3	5
	Macho	857.5 \pm 6.12	42.5 \pm 2.04	2
192	J2	450 \pm 0	25 \pm 0	1
	J3	600 \pm 40.82	37.5 \pm 2.04	2
	J4	633.33 \pm 20.41	41.66 \pm 2.04	3
	Macho	787.5 \pm 37.08	50 \pm 3.16	4
	Hembra	1025 \pm 115.72	69.16 \pm 4.15	6
216	J1	380 \pm 0	20 \pm 0	1
	J2	425 \pm 20.41	25 \pm 0	2
	J3	652.5 \pm 2.04	41 \pm 0.81	2
	J4	850 \pm 0	35 \pm 0	1
	Macho	733.33 \pm 20.41	41.66 \pm 2.04	3
240	J4	750 \pm 0	55 \pm 0	1
	Hembra	1062.5 \pm 48.74	71.25 \pm 1.93	4
	Macho	850 \pm 0	45 \pm 0	1
264	J1	350 \pm 0	20 \pm 0	1
	J2	400 \pm 0	25 \pm 0	1
	J3	515 \pm 28.57	20 \pm 0	2
	Hembra	1050 \pm 53.45	65 \pm 5.34	6
	Macho	900 \pm 0	50 \pm 0	1

Se pudieron observar NEPs a partir de las 72 horas, a partir de las cuales se fueron observando los distintos estadios, observando adultos a partir de las 96 horas iniciado el experimento, y a su vez, pudimos observar machos hasta las 144 horas, aunque en menor proporción en la mayoría del tiempo. Si bien, pudimos observar las distintas etapas en el transcurso de las horas, las cantidades fueron variando, pero siempre coincidiendo en observar cada una de ellas. Con lo cual, podemos asumir que hay mínimo dos generaciones de NEPs en el interior de las larvas de *G. mellonella*.

A continuación, pueden observarse algunas etapas correspondientes a esta especie de nemátodo en particular (Figura 5), resaltando principalmente un macho y una hembra, así como un posible J3, ya que es posible que, por su tamaño y características, pertenezca a esta etapa de desarrollo.



Fig. 5.- (A) Macho. (B) Juvenil infeccioso. (C) Hembra grávida observados a distintos objetivos (40 x y 100 x).

Con esto pudimos observar las distintas etapas y características de ellas a lo largo del desarrollo del NEP.

8.2 Ciclo de vida de *Osccheius myriophila*

Se realizó el monitoreo del ciclo de vida de la cepa MC5, utilizando la temperatura de 27 °C y con un inóculo de 200 JI por larva de *G. mellonella*.

Se pudo observar que al día 4 el 100% de las larvas infectadas habían muerto (cuadro 5):

Cuadro 5.- Porcentaje de mortalidad de larvas de *G. mellonella* infectadas con JI de la cepa MC5.

Días posteriores a la inoculación	% de mortalidad
1	0
2	20
3	80
4	100

Se pudieron observar a partir del día 2, NEPs pequeños al interior de la larva de *G. mellonella*.

A la par, se fue sembrando una pequeña cantidad de hemolinfa en cajas con medio LB, y con esto se pudo corroborar la razón de la mortalidad de las larvas, ya que, aunque a partir de las 8 horas se pudo encontrar una mínima cantidad de JI dentro, fue hasta el día 4 en el que se pudo observar el crecimiento de una bacteria en el medio de cultivo, lo cual coincide con el tiempo en el que el 100 % de las larvas mueren.

Se realizaron trabajos de fijación y aclaramiento de los NEPs observados en el interior de las larvas, los resultados se presentan a continuación:

A las 8 horas, se observaron larvas J3 y midieron 550 µm de largo y 30 µm de ancho, de igual forma se observaron a las 12 horas, y se encontraron J3, asimismo, a las 48

horas se vió 1 J1, el cual al analizarlo se encontró que mide entre 200 y 220 μm de largo, y 20 μm de ancho, sin órganos visibles y transparente.

A las 72 horas se observaron J2, algunos con doble cutícula, y midieron entre 450 y 40 μm de ancho y largo, respectivamente.

En las próximas horas, es decir, a las 96, se apreciaron J3 y J4, de 550 – 40 μm y 650 – 45 μm respectivamente, cabe mencionar que se observó la presencia de bacterias en su interior, a lo largo de su intestino, y la hemolinfa proveniente de estas larvas al sembrarse en medio LB tuvo crecimiento bacteriano de su simbionte.

A las 120 horas, pudieron observarse hembras con una longitud de entre 1100 μm de largo y 70 μm de ancho, además se observaron huevos en el interior de la hembra, y los machos midieron entre 1000 μm de largo y 40 μm de ancho, siendo este tiempo el adecuado para la primera generación de adultos.

El análisis a las 144 horas dió como resultado la aparición de hembras grávidas con medidas de 1300 μm de largo y 90 μm de ancho, además de J1 de entre 250 μm de largo y 20 μm de ancho, sin poder apreciarse órganos visibles en su interior.

A las 168 horas pudimos observar J1, J2 y J3, los tamaños fueron de 250 – 20 μm , 380 – 25 μm y 550 – 40 μm respectivamente, además de observarse bacterias en su interior.

En el siguiente periodo de observación hubo J4 y adultos en su mayoría, siendo las medidas de estos entre 600 μm de largo y 50 μm de ancho.

Así, a las 216 horas transcurridas se podían ver prácticamente todos los estadios de los NEPs y hembras de 900 μm de largo y 60 μm de ancho, es decir, un poco más pequeñas que las observadas al día 5.

Se observaron durante 3 periodos más, es decir, a las 240 horas, 264 y 288. Se encontraron J1, J2, J3, J4 y adultos oscilando las medidas mostradas a continuación: J1: 250 – 20 μm ; J2: 300 – 30 μm ; J3: 550 – 30 μm y J4: 700 – 40 μm , Hembras grávidas oscilaron entre los 1000 μm de largo y 80 μm de ancho y los machos entre 900 y 55 μm . Esta información se resume en el cuadro 6 que se muestra a continuación:

Cuadro 6.- Los resultados del desarrollo de *O. myriophila*, donde se determinaron las medidas de largo y ancho en las diferentes etapas de desarrollo (media \pm DE) y se observó la n respectiva en cada caso (N/V: no aplica).

Horas	Etapa	Promedio \pm D.E.		n
		Largo (μm)	Ancho (μm)	
8	J3	526.66 \pm 20.54	38.33 \pm 2.35	3
12	J3	535 \pm 11.18	35.75 \pm 3.76	4
24	NA	NA	NA	NA
48	J3	525 \pm 20.61	33.83 \pm 3.43	6
72	J3	510 \pm 28.86	37 \pm 3.16	7
96	J4	608 \pm 30.22	42.6 \pm 2.24	5
120	J4	610 \pm 26.07	43.6 \pm 1.95	5
	Hembra	1090 \pm 48.98	78 \pm 6.78	5
144	Hembra	1320 \pm 52.38	90 \pm 3.16	5
	J1	256 \pm 25.76	22 \pm 1.89	5
168	J1	250 \pm 18.97	22 \pm 2.44	5
	J2	386 \pm 64.37	28 \pm 6.78	5
	J3	582 \pm 38.67	43 \pm 5.09	5
192	J4	615 \pm 35.93	40.8 \pm 3.43	6
	Hembra	850 \pm 44.72	68 \pm 2.44	5
216	Hembra	906 \pm 33.82	65 \pm 3.16	5
240	Hembra	990 \pm 66.33	75 \pm 4.47	5
	J1	240 \pm 27.56	22 \pm 2.44	5
264	J3	516.66 \pm 23.57	35 \pm 2.88	6
	J4	576 \pm 22.44	56 \pm 5.09	5
	Hembra	980 \pm 24.49	80 \pm 3.16	5
	Macho	850 \pm 54.77	56 \pm 8.60	5
288	J4	620 \pm 40	55 \pm 3.16	5
	Hembra	1008.33 \pm 53.35	83.33 \pm 2.35	6

Todos los estadios fueron observados sin utilizar colorantes, y fueron analizados con ayuda de un microscopio óptico.

Los diferentes estadios tienen características particulares, pero a continuación se muestran todos los observados (Figura 6):

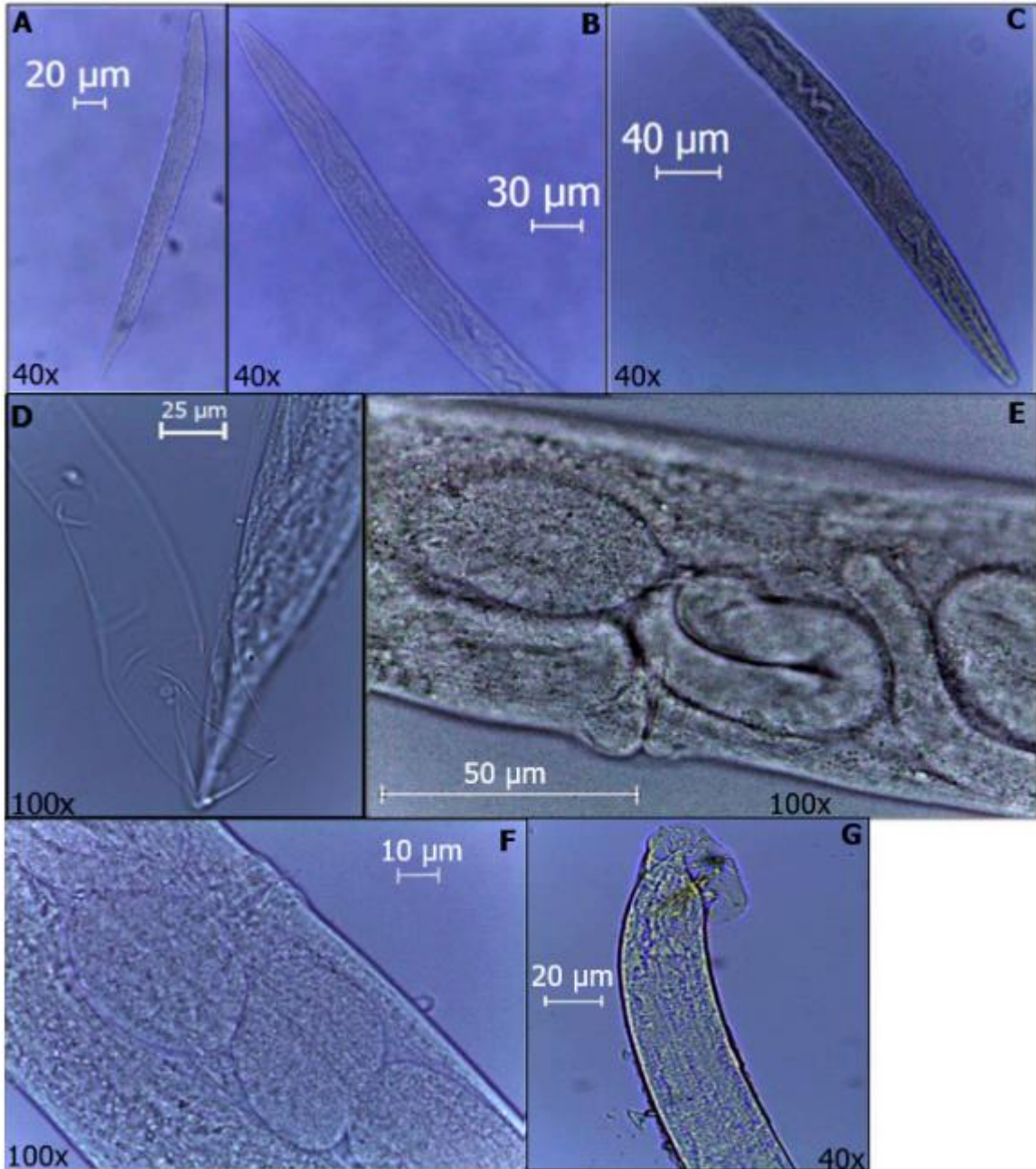


Fig. 6.- Desarrollo de *O. myriophila*. (A) J1. (B) J2. (C) J3. (D) J4. (E) Hembra con endotokia matricida. (F) Hembra con huevos en su interior. (G) Macho con rayos y espícula visibles.

Los adultos, tanto machos como hembras, fueron observados a 100 x y se pudieron observar hembras grávidas, y a su vez, machos en menor proporción. Las hembras tienen la vulva situada en la parte media del cuerpo y los machos son de menor tamaño.

Se observó la primera generación de adultos a los 5 días de la inoculación y la segunda generación a los 9 días, cabe recalcar que el tamaño es distinto entre una y otra, siendo que los adultos de la segunda generación son más pequeños que los de la primera.

Sáenz y colaboradores, realizaron una comparación con distintas temperaturas, siendo la óptima para ellos la de 24 °C, para *Steinernema feltiae*, y a esta temperatura, su ciclo fue de 8 días en promedio.

8.3 Ciclo de vida de *Caenorhabditis brenneri*

De igual forma se realizó el seguimiento del ciclo con *C. brenneri*, a la temperatura de 27 °C, los resultados se presentan en el cuadro 7.

Cuadro 7.- Los resultados del desarrollo de *C. brenneri*, donde se determinaron las medidas de largo y ancho en las diferentes etapas de desarrollo (media \pm DE) y se observó la n respectiva en cada caso (N/V: no aplica).

Horas	Etapa	Promedio \pm D.E.		n
		Largo (μ m)	Ancho (μ m)	
8	NA	NA	NA	NA
12	NA	NA	NA	NA
24	NA	NA	NA	NA
48	NA	NA	NA	NA
72	J3	466.66 \pm 20.41	28.33 \pm 2.04	3
96	J4	625 \pm 20.41	32.5 \pm 2.04	2
120	J4	616 \pm 20.42	48.33 \pm 8.5	3
144	J4	666.6 \pm 57.73	55 \pm 10.8	6
	Hembra	981.1 \pm 87.57	79.44 \pm 9.84	9
168	J3	537 \pm 21.68	32 \pm 3.31	10
	Hembra	1200 \pm 0	80 \pm 0	1
192	J3	550 \pm 0	30 \pm 0	1
	J4	766.6 \pm 41.57	66.6 \pm 4.67	3
	Hembra	990 \pm 58.10	78 \pm 11.66	5
216	J1	250 \pm 0	15 \pm 0	1
	J4	800 \pm 34.35	58.33 \pm 9.42	6
	Hembra	966.66 \pm 41.57	63.33 \pm 4.71	3
240	J1	270 \pm 0	20 \pm 0	1
	J3	543.33	40 \pm 1.1	3
	J4	737.5 \pm 20.49	46.25 \pm 4.14	4
	Hembra	960 \pm 73.32	64 \pm 4.89	5

En esta especie no pudimos observar machos, pero observamos que hubo reproducción a lo largo de los días, el desarrollo del NEP fue avanzando y de igual forma se observó más de una generación en el interior de las larvas de *G. mellonella*

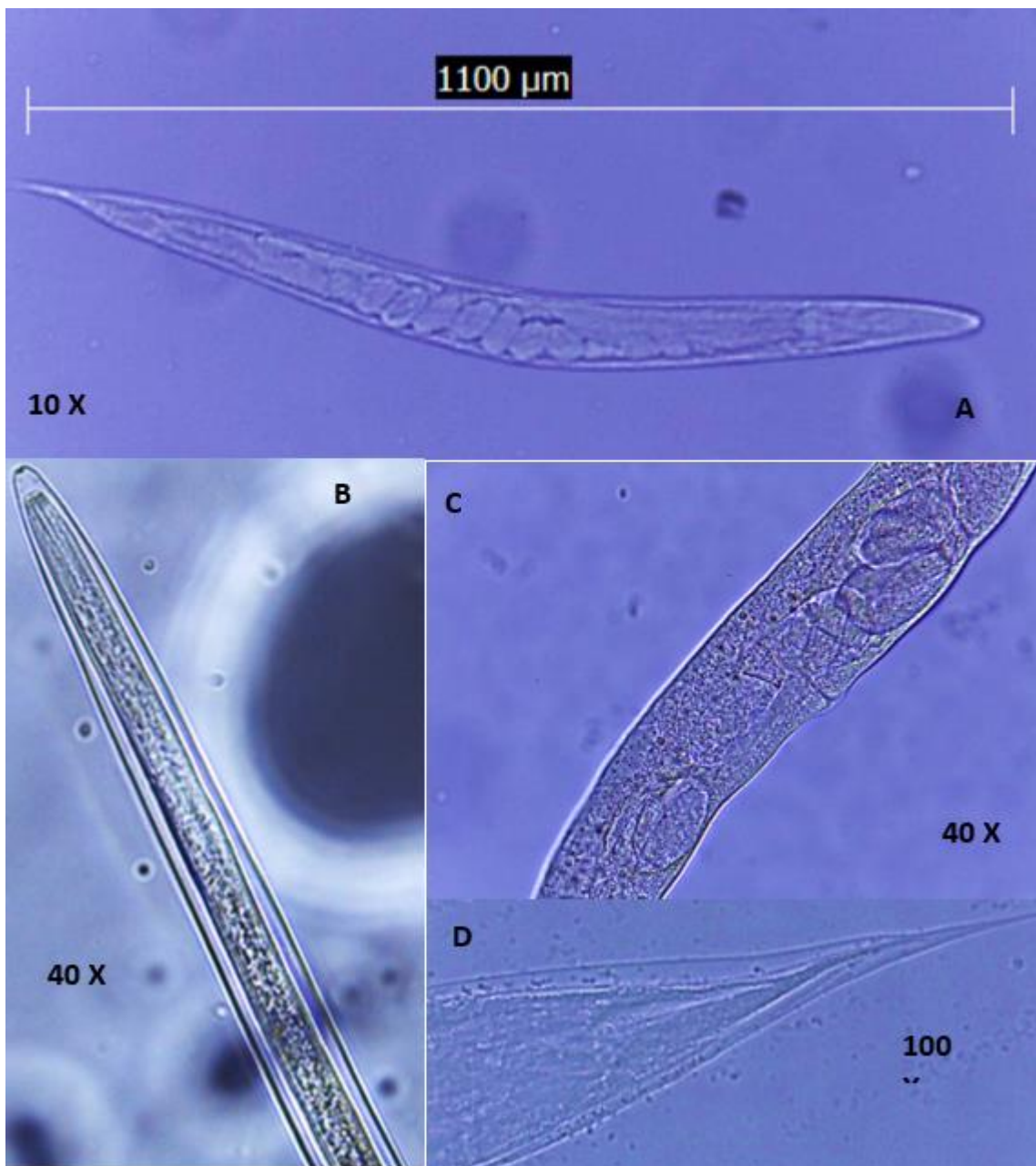


Fig. 7.- Desarrollo de *C. breneri*. (A) Hembra grávida. (B y D) J3 con doble cutícula. (C) Hembra con endotokia matricida.

La primera generación de adultos pudo observarse a partir de las 144 horas de infección de las larvas, variando a lo largo de su desarrollo la cantidad de demás etapas de desarrollo, pero

también pudimos observar, que, a partir de las 192 horas, a pesar de observar hembras, éstas fueron de menos tamaño que las observadas inicialmente.

Esta especie en particular, fue la que menor tamaño presentó de las estudiadas en el presente trabajo, lo cual pudo ser una razón por la cual no observamos tan fácilmente las diferentes etapas al momento de observarlas al microscopio.

8.4 Propagación *in vivo* de *Heterorhabditoides* sp.

Continuando con la investigación presente, el NEP utilizado para los primeros experimentos en la propagación *in vivo* fue *Heterorhabditoides* sp., utilizando larvas de *G. mellonella*, las cuales fueron previamente pesadas, oscilando sus pesos entre 0.20 y 0.30 gramos, cada larva fue infectada con 50 JI y los conteos de NEPs se realizaron cada 48 horas, a partir del día 5 después de la infección.

Los NEPs obtenidos hasta el día 29 se muestran a continuación (Figura 8):

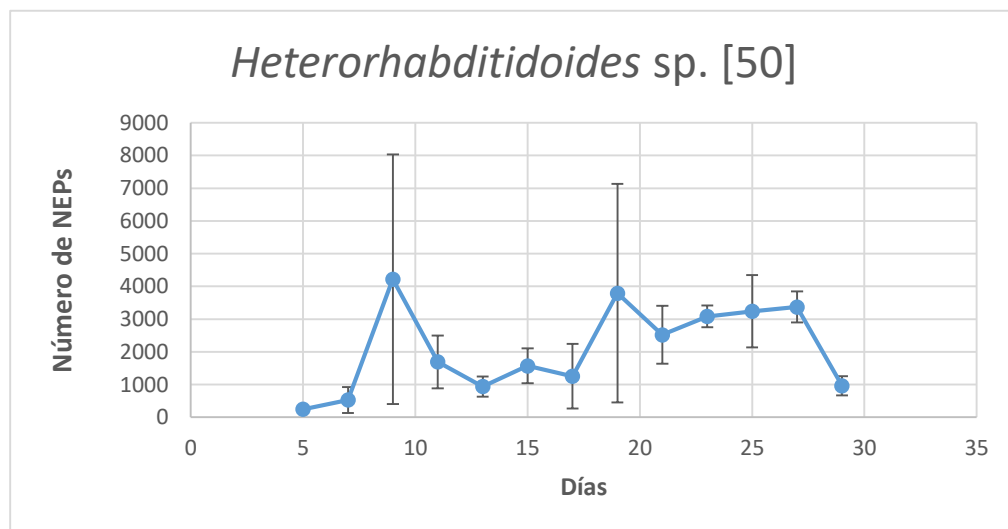


Fig. 8.- Número de NEPs producidos por larva de *G. mellonella* a 27 °C al día 29 con 50 JI con su respectiva desviación estándar.

La mayor cantidad de NEPs producidos fueron al día 9, como puede observarse en la figura 14, con 4220 NEPs por larva, siendo la temperatura de 27 °C.

Factores como lo son la temperatura, aireación y humedad, los cuales, con factores ambientales comunes, puedes afectar el rendimiento de producción, y

especialmente la temperatura, afecta debido a que de ésta depende la duración del ciclo de vida según Grewal y colaboradores (1997), además afirman que la temperatura está relacionada con el clima de donde son originarios los NEPs.

Shapiro-Ilan y colaboradores (2014) afirman también que el rendimiento de JI por huésped entre las distintas especies de NEPs es inversamente proporcional al tamaño de JI, sin embargo, algunas especies simplemente cuentan con capacidades reproductivas muy altas, como por ejemplo, *Heterorhabditis indica* y *Steinernema riobrave*, que en *G. mellonella* alcanza un rendimiento de más de 300, 000 JI por larva en el caso de *S. riobrave* (con una longitud corporal de 662 mm en promedio por JI), y en el caso de *S. glaseri* alcanza un rendimiento que no excede los 50, 000 JI en el mismo hospedero, en este caso con un tamaño de JI promedio, de 1133 mm, según Grewal y colaboradores (1994).

Asimismo, se continuó con el monitoreo para obtener más datos de la reproducción de NEPs de esta cepa a las distintas temperaturas e inóculo por larva de *G. mellonella*, con el fin de establecer las condiciones correspondientes.

Se realizó un monitoreo de producción, utilizando ahora 100 JI por larva de *G. mellonella*, durante 19 días, manteniendo las larvas a una temperatura de 30 °C.

El número de JI producidos fue monitoreado, obteniendo una mayor producción al día 19 con un promedio de 4036 JI. A continuación, en la figura 9, se muestra la gráfica con los resultados:

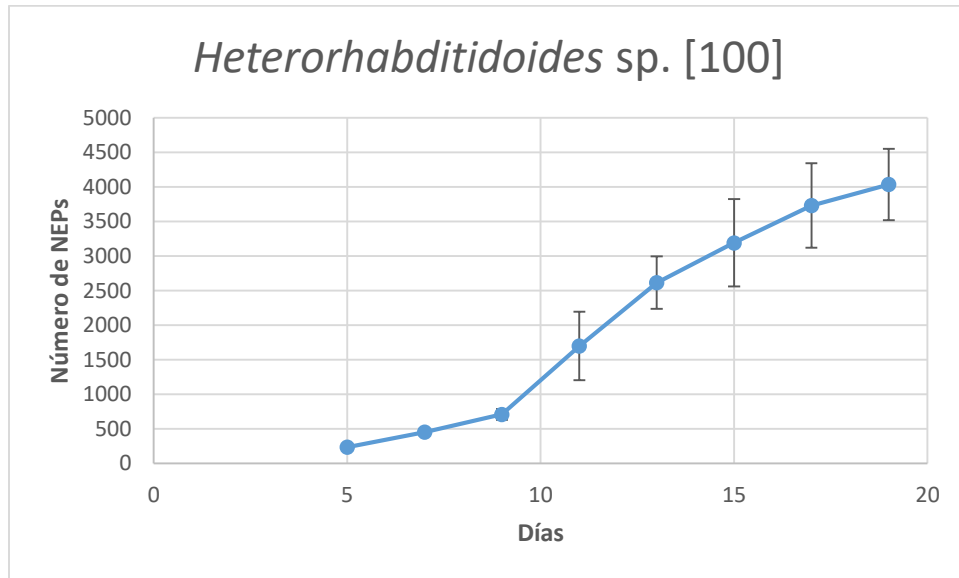


Fig. 9.- Número de NEPs producidos por larva de *G. mellonella* a 30 °C al día 19 con 100 JI con su respectiva desv. estándar.

Posteriormente, se repitió el experimento utilizando 100 JI en larvas de *G. mellonella* a una temperatura de 30 °C, las larvas fueron pesadas inicialmente. Las condiciones a las cuales se realizó inicialmente no fueron las óptimas, debido a una falta de humedad considerable, a consecuencia de la alta temperatura a la cual fueron expuestos (30 °C), y si bien, la humedad en extremo tampoco favorece la movilidad de los NEPs, la falta de ella también es perjudicial (Koppenhofer y Fuzi, 2007).

La temperatura afecta en gran medida la actividad de los NEPs (Kaya, 1990). Se reporta que la exposición de estos a temperaturas extremas (< 0 °C o > 40 °C) es letal para la mayoría de las especies de NEPs según Brown y Gaugler (1996).

El monitoreo se realizó durante 26 días (Figura 10), observando una mayor cantidad de NEPs producidos al día 21, siendo esta de 8023, por otro lado, la producción total de NEPs a lo largo de los días fue de 56, 715 aproximadamente, enseguida se puede observar la gráfica de producción:

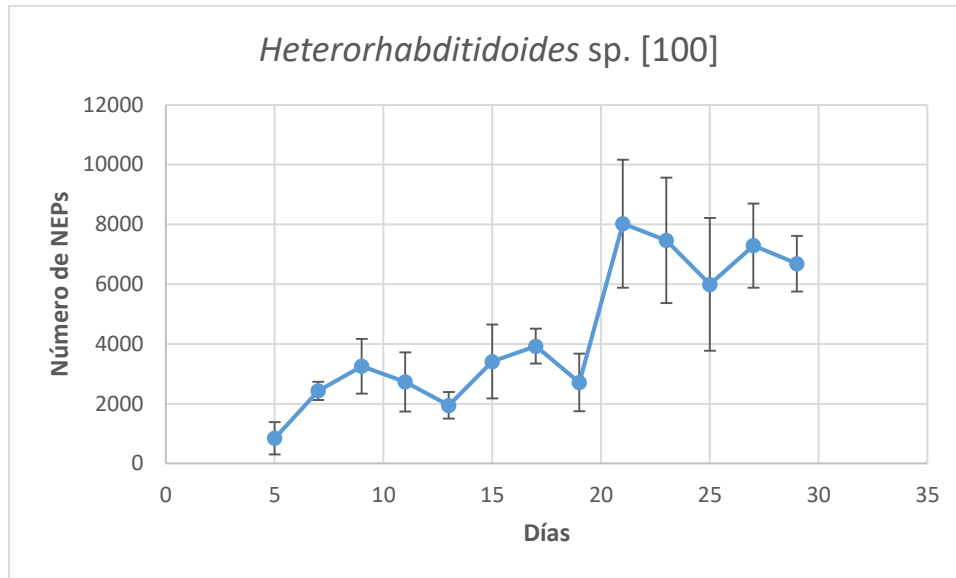


Fig. 10.- Número de NEPs producidos por larva de *G. mellonella* a 30 °C al día 26 con 100 JI.

Además, se realizó un conteo de punto final utilizando 5 larvas de *G. mellonella* infectadas con 500 JI, a tres diferentes temperaturas, siendo éstas: 20 °C, 27 °C y 30 °C; los resultados se muestran en el cuadro 8:

Cuadro 8.- Número de NEPs producidos en larvas de *G. mellonella*, 21 días después de la infección con *Heterorhabditoides* sp. a tres diferentes temperaturas, promedio y desviación estándar, además de prueba Tukey (letras iguales indican que no hay diferencias significativas).

Temperatura	Número de JI [500] en 5 larvas de <i>G. mellonella</i> Promedio ± Desv. Std.
20 °C	17716 ± 2273.3577 B
27 °C	31858 ± 799.7534 A
30 °C	6020 ± 532.4158 C

Para el análisis de datos, se realizó una transformación (método de raíz cuadrada). Se puede observar que hubo diferencias significativas en cada uno de los tratamientos evaluados, siendo el de 27 °C el que tuvo un mayor número de NEPs resultantes. Cabe recalcar que en un inicio se planeaba analizar la producción con una temperatura más (24 °C) el cual es un tratamiento que permitiría observar un panorama más amplio respecto a producción *in vivo*.

Además, se presentaron algunos problemas en cuanto a la humedad adecuada, esto especialmente con la temperatura a 30 °C, ya que al evaporarse el agua rápidamente, los NEPs pudieron tener dificultades para su movimiento y por lo tanto, problemas al momento de infectar a las larvas de *G. mellonella*, por lo cual se repitió el experimento.

Cuadro 9.- Número de NEPs producidos en larvas de *G. mellonella*, 21 días después de la infección con *Heterorhabditoides* sp. a cuatro diferentes temperaturas, promedio y desviación estándar (letras iguales indican que no hay diferencias significativas)

Temperatura	Número de JI [500] en 5 larvas de <i>G. mellonella</i> Promedio ± Desv. Std.
20 °C	17716 ± 2273.3577 A
24 °C	17150 ± 8879.9164 A
27 °C	31858 ± 799.7534 A
30 °C	16216 ± 5416.2307 A

Los resultados se presentan a continuación (cuadro 7), ya que se realizó la propagación de punto final con las temperaturas de 24 °C y de 30 °C para obtener una mayor información en cuanto a la producción respecto a la temperatura.

Debido a los resultados obtenidos, se decidió realizar un análisis de la tasa de producción utilizando la siguiente fórmula:

$$Rf = \frac{Pf}{Pi}$$

En dónde:

Rf = Índice o tasa de producción.

Pf = Población final (Promedio de JI producidos)

Pi = Población inicial

De este modo obtuvimos los siguientes resultados (Cuadro 10):

Cuadro 10.- Tasa de producción obtenida al día 21 para las 4 temperaturas utilizadas con una concentración inicial de 500 JI, con su respectivo promedio y desviación estándar (letras iguales indican que no hay diferencias significativas).

Repetición	20 °C	24 °C	27 °C	30 °C
1	32.4	16.25	65.87	22.5
2	41.86	28.2	62.04	47.5
3	32.04	58.45	63.24	27.3
Promedio ± Desv. Est.	35.43 ± 4.54 A	34.3 ± 17.75 A	63.71 ± 1.59 A	32.43 ± 10.83 A

Las temperaturas óptimas para supervivencia, infección y reproducción varían entre las diferentes especies y cepas de NEPs según Grewal y colaboradores (1994), así como según Hazir y colaboradores (2001). Así como hay nemátodos tolerantes al calor, los hay tolerantes al frío, manteniendo su eficiencia (Shapiro-Ilan *et al.*, 2012). Es por eso, que es importante conocer los rangos que cada cepa tolera, para de este modo tener una referencia inicial, ya que las cepas utilizadas en este trabajo, al ser nativas de Morelos, es posible que presenten temperaturas similares para su óptimo aprovechamiento.

Con la información obtenida hasta este punto, se decidió realizar una propagación *in vivo* con distintas concentraciones iniciales, siendo de 100, 500 y 1000 JIs (figura 11). Los resultados se muestran a continuación:

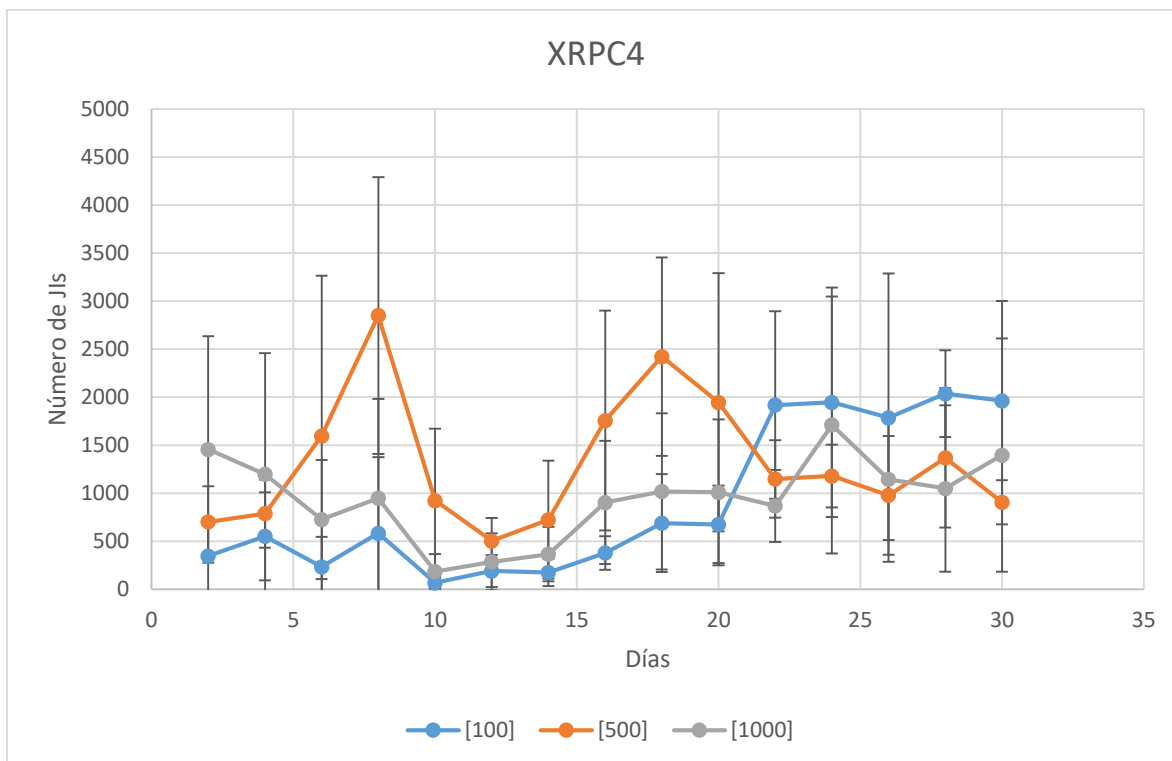


Fig. 11.- Número de JIs producidos por larva de *G. mellonella* a 27 °C al día 30 con 3 distintas concentraciones iniciales.

Y los resultados se presentan en el cuadro mostrado a continuación (cuadro 11):

Cuadro 11.- Número de NEPs producidos en larvas de *G. mellonella* durante 24 días con *Heterorhabditoides* sp. a 3 diferentes concentraciones de JI a una temperatura de 27 °C, promedio y desviación estándar, además de prueba Tukey, $p=0.28$ y C.V.= 23.10 (letras iguales indican que no hay diferencias significativas).

Concentración de JI 27 °C	Número de JI por larva Promedio \pm desv. Est.
[100]	13541 \pm 4872.43 A
[500]	19792 \pm 3269.13 A
[1000]	14266 \pm 9286.69 A

Los resultados finales se conocerán más adelante, pero mientras tanto, no se observan diferencias significativas en los obtenidos hasta este punto.

8.5 Propagación *in vivo* de *Caenorhabditis brenneri*

Propagación *in vivo* con distintas concentraciones, pero utilizando *G. mellonella* fueron realizadas también con la cepa DS, a la cual pertenece el NEP *Caenorhabditis brenneri*, y se observan a continuación:

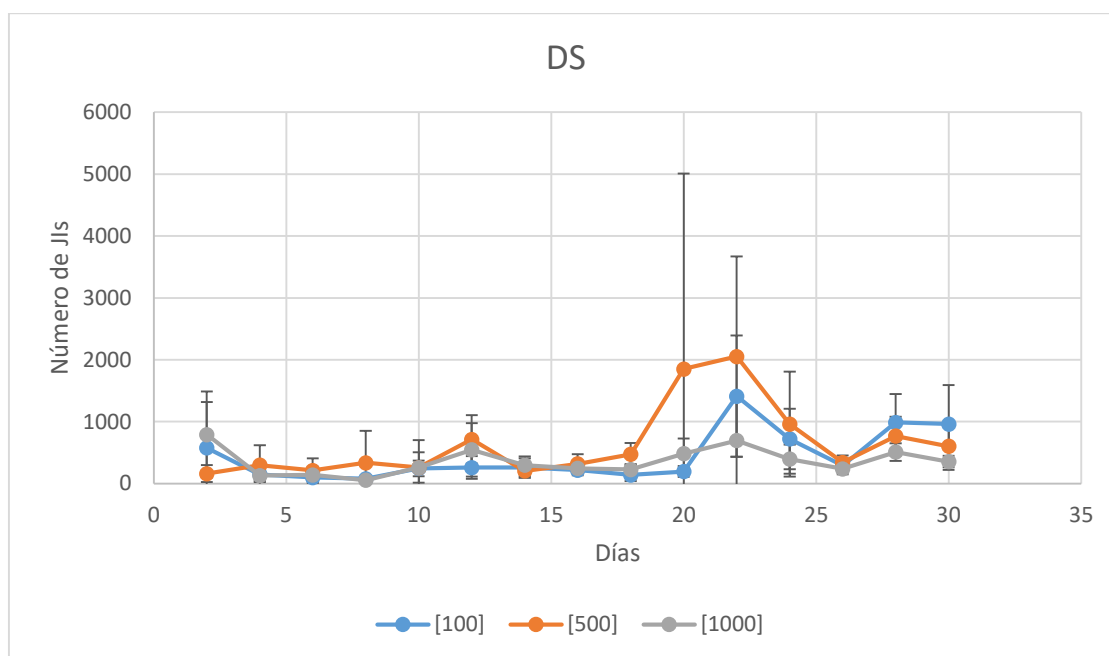


Fig. 12.- Número de JIs producidos por larva de *G. mellonella* a 27 °C al día 30 con 3 distintas concentraciones iniciales.

Y los resultados se muestran en el cuadro 12.

Cuadro 12.- Número de NEPs producidos en larvas de *G. mellonella* durante 24 días con *Caenorhabditis brenneri* a 3 diferentes concentraciones de JI a una temperatura de 27 °C, promedio y desviación estándar, además de prueba Tukey, $p=0.18$ y C.V.= 22.40 (letras iguales indican que no hay diferencias significativas).

Concentración de JI 27 °C	Número de JI por larva Promedio \pm desv. Est.
[100]	6584 \pm 1776.70 A
[500]	9546 \pm 4679.01 A
[1000]	5356 \pm 1712.40 A

De igual forma, los resultados no son definitivos, ya que aún falta monitorear la producción hasta el agotamiento de recursos para los NEPs.

8.6 Propagación *in vivo* de *Oscheius myriophila*

Asimismo, se realizaron pruebas de producción *in vivo* utilizando la especie *Oscheius myriophila* (cepa MC5), para lo cual se utilizaron larvas de *G. mellonella* que fueron pesadas previamente, eligiendo larvas con pesos entre 0.20 y 0.30 gramos, las cuales fueron colocadas en cajas petri con su respectivo círculo de papel filtro de forma individual.

Cada larva fue infectada individualmente con 1000 JI de la cepa MC5 y los conteos fueron realizados cada 48 horas a partir del día 4 después de la infección, durante este tiempo se mantuvieron a una temperatura de 30 °C y con humedad constante, para lo cual fueron envueltos con papel Parafilm, y de este modo tratar de conservar al máximo la humedad dentro de la caja de Petri.

Se monitoreó también el tiempo en el que las larvas murieron, encontrándose que con esta especie y con estas condiciones de temperatura y concentración de NEPs murieron al día 4 a partir de la infección, motivo por el cual fue el día de inicio de conteo de NEPs y realizándose hasta el día 20 después de la infección.

La gráfica con el número de NEPs producidos se muestra a continuación (Fig. 13):

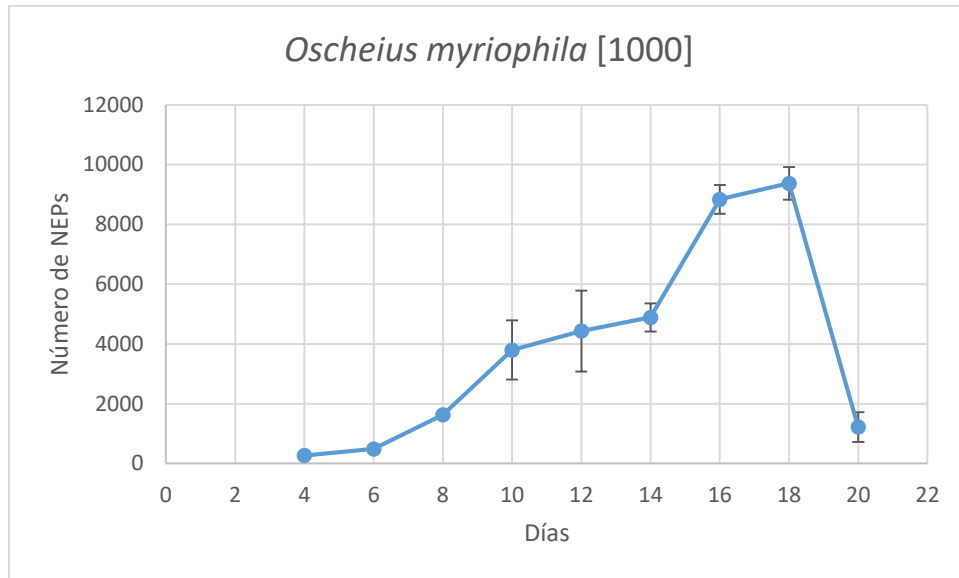


Fig. 13.- Número de NEPs producidos por larva de *G. mellonella* a 30 °C al día 20 con 1000 JI.

Como se puede observar en la gráfica, el día con mayor producción de NEPs fue el 18 a partir de la infección, ya que al momento de realizar el conteo se encontró la cantidad en promedio de 9372 NEPs por larva de *G. mellonella*. Para las 48 horas siguientes, el número de NEPs disminuyó bastante, por lo cual, su monitoreo fue únicamente al día 20. Cabe mencionar que la cantidad total de la producción a lo largo de los 20 días, fue de 34937 aproximadamente.

Asimismo, se realizó también un monitoreo con concentración inicial variada para conocer un poco más acerca de esta especie estudiada y cómo influye la concentración inicial en la tasa de reproducción, siendo algunos parámetros importantes para el estudio de esta y las distintas cepas en el presente trabajo.

Los resultados de este experimento se muestran a continuación:

Se utilizó la especie *Oscheius myriophila* (cepa MC5) infectando larvas de *G. mellonella*, para lo cual se pesaron previamente y sus pesos elegidos fueron entre 0.20 y 0.30 gramos, cada larva fue colocada en una caja Petri de 60 x 15 mm y asimismo infectada con 1000 JI y los conteos de NEPs se realizaron cada 48 horas, a partir del día 8 después de la infección, las cuales se mantuvieron a una temperatura de 27 °C.

Los resultados se muestran a continuación (Fig. 14):

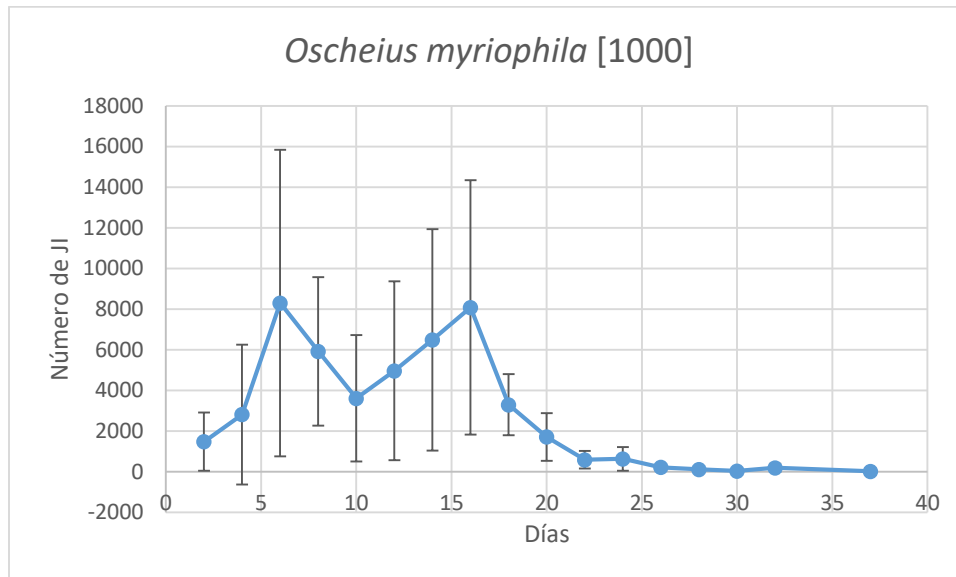


Fig. 14.- Número de JI producidos por larva de *G. mellonella* a 27 °C al día 39 con 1000 JI.

El monitoreo se realizó durante 39 días, observando una mayor cantidad de JI producidos al día 6, siendo esta de 8304 y dando un total de 48496 ± 15058.9197 (promedio \pm desv. Est.) JI obtenidos.

Asimismo, se realizó la misma metodología con una concentración inicial de 500 JI, obteniendo los resultados de la figura 15:

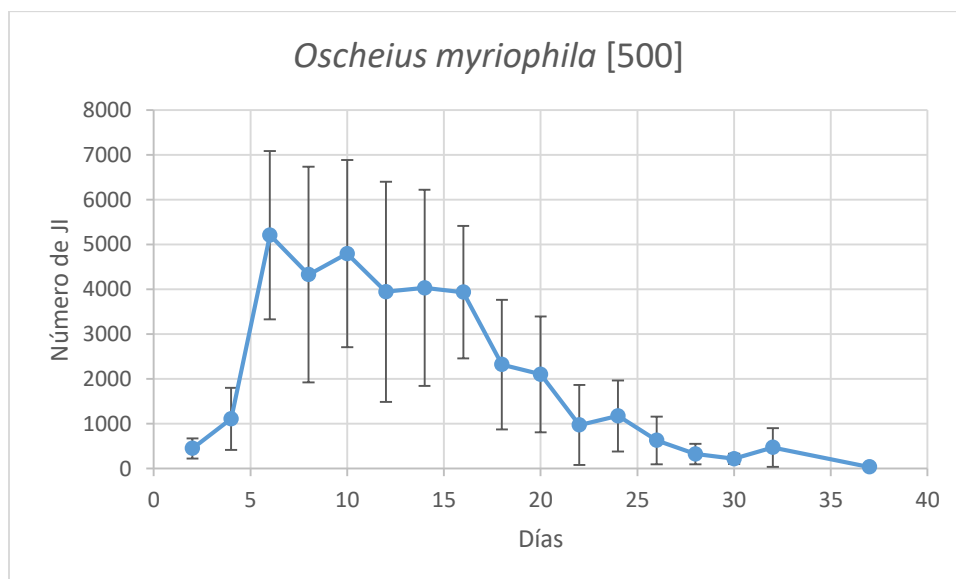


Fig. 15.- Número de JI producidos por larva de *G. mellonella* a 30 °C al día 37 con 500 JI.

El monitoreo se realizó durante 37 días, observando una mayor cantidad de JI producidos al día 6, siendo esta de 5208 y dando un total de 36058 ± 4917.4399 (promedio \pm desv. Est.) JI obtenidos.

Se realizó también la evaluación con la concentración inicial de 100 JI, siendo esta la menor, a continuación, podemos observar la gráfica con los resultados (Fig. 16):

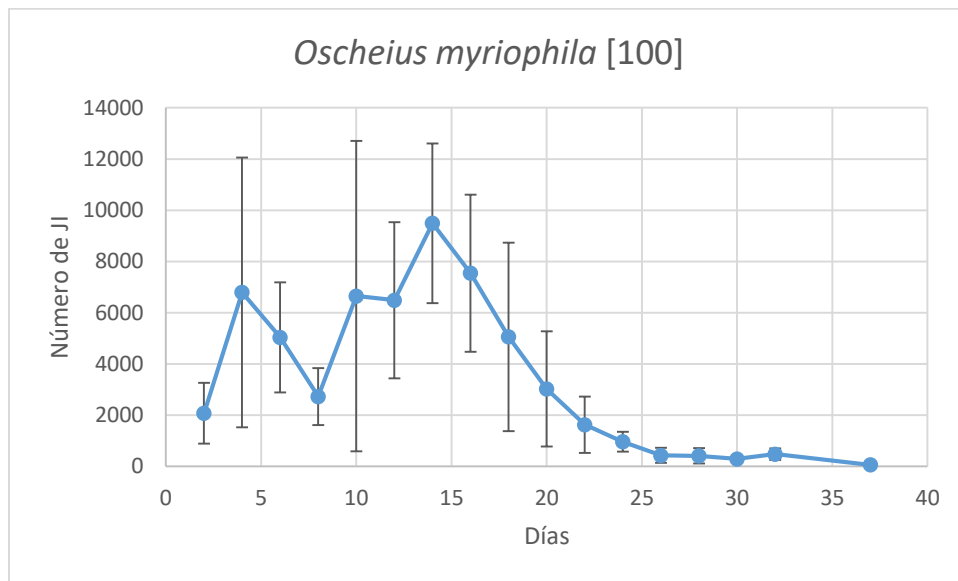


Fig. 16.- Número de JI producidos por larva de *G. mellonella* a 27 °C al día 37 con 100 JI.

Monitoreando durante 37 días la producción, se observó una mayor cantidad de JI producidos al día 14, siendo esta de 9 490 y dando un total de $59 165 \pm 12503.9874$ (promedio \pm desv. Est.) JI obtenidos con el inóculo de 100 JI iniciales.

Podemos observar los resultados en la figura 17 mostrada a continuación:

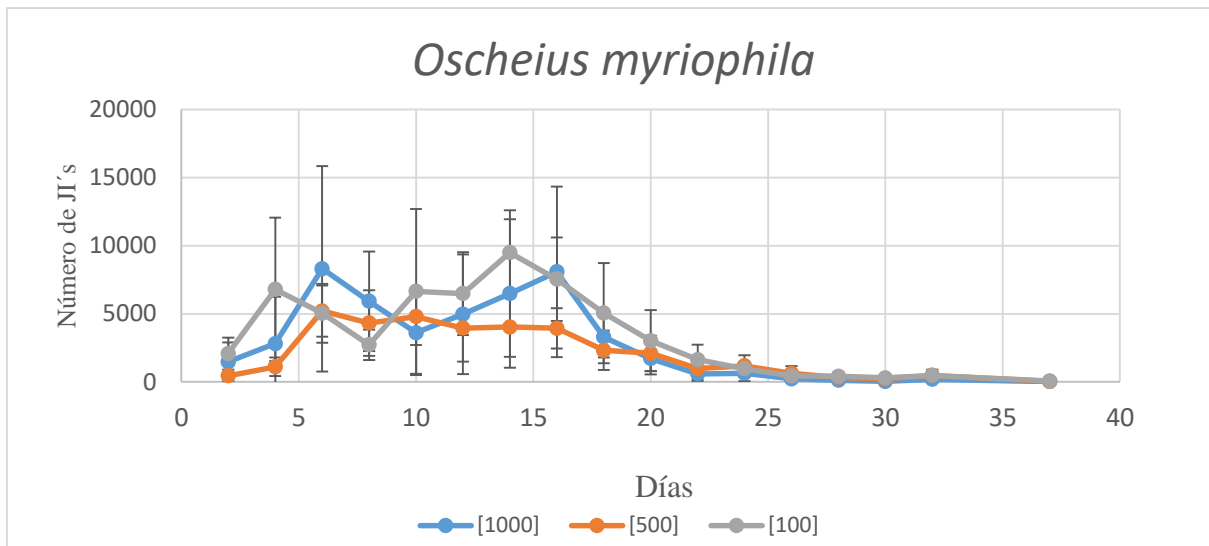


Fig. 17.- Número de JIs producidos por larva de *G. mellonella* a 27 °C al día 37 con 3 distintas concentraciones iniciales, durante 37 días ± DE.

A continuación, se observa un cuadro con los resultados obtenidos con el procedimiento descrito anteriormente, comparando las distintas concentraciones iniciales para infectar las larvas (Cuadro 13).

Cuadro 13.- Número de NEPs producidos en larvas de *G. mellonella* durante 37 días con *Oscheius myriophila* a 3 diferentes concentraciones de JI a una temperatura de 27 °C, promedio y desviación estándar, además de prueba Tukey (letras iguales indican que no hay diferencias significativas).

Concentración de JI 27 °C	Número de JI por larva Promedio ± desv. Est.
[100]	59165 ± 12503.98 A
[500]	36058 ± 4917.43 AB
[1000]	48496 ± 15058.91 B

De los resultados obtenidos se pueden observar distintas cuestiones, que coinciden con diversos autores, ya que, si hablamos de producción, las cantidades obtenidas se encuentran dentro de las medias reportadas por diversos autores, como Realpe y colaboradores, que en el 2007 encontraron en un estudio de producción con larvas de *G. mellonella* que se pueden obtener un promedio de JI de 86 250 para *Steinernema*

colombiense y de 78 750 para *Heterorhabditis bacteriophora*, que si bien, son valores ligeramente elevados al compararlos con los obtenidos en este proyecto, también se han reportado valores de entre 30 000 y 240 000 JI por larva para distintas especies de NEPs (Lindergreen, *et al.*, 1993).

Además de que autores como Ortiz y colaboradores (1994) mencionan que las producciones pueden variar mucho entre sí, y la disminución de esta, puede ser causada por diversos factores, entre los que encontramos la edad, tamaño, así como también la susceptibilidad del insecto hospedero que se esté utilizando, y las propias condiciones ambientales e incluso el inóculo utilizado (Boff, *et al.*, 2000).

Es importante recalcar también, que las temperaturas óptimas para supervivencia, infección y reproducción pueden variar entre las diferentes especies y cepas de NEPs según Grewal y colaboradores (1994), así como según Hazir y colaboradores (2001).

Lo cual coincide con lo observado en este trabajo, dependiendo de las condiciones de humedad, temperatura y concentración de inóculo se observó una menor o mayor producción de JI.

Si bien, se sabe que así como hay nemátodos tolerantes al calor, los hay tolerantes al frío, manteniendo su eficiencia (Shapiro-Ilan *et al.*, 2012), es un parámetro que se debe evaluar para conocer mejor a la cepa con la cual estamos trabajando. Es por eso, que es importante conocer los rangos que cada cepa tolera, para de este modo tener una referencia inicial.

8.7 Propagación *in vitro* en medio sólido bidimensional

Los resultados obtenidos en esta parte del Proyecto no fueron favorables, ya que si bien, se realizaron diversas propuestas y mejoras a la metodología utilizada, recordemos que al trabajar con nemátodos entomopatógenos nativos, no hay suficiente información acertada para el correcto desarrollo de la misma.

VARIABLES COMO LA TEMPERATURA JUGARON UN PAPEL FUNDAMENTAL PARA QUE LOS RESULTADOS NO FUERAN LOS ESPERADOS, POR LO CUAL, ES IMPORTANTE PROBAR CON DISTINTOS MEDIOS DE CULTIVO Y FORMAS DE DESINFECCIÓN QUE NO AFECTEN A LOS NEMATÓDOS E IMPIDAN SU REPRODUCCIÓN CORRECTA DE FORMA *in vitro* EN UN FUTURO.

9.- CONCLUSIONES

- La cantidad de JI producidos a pesar de ser relativamente pequeña se encuentra dentro de las medias producidas en especies de NEPs distintas a las utilizadas en este trabajo.
- El inóculo de menor cantidad de JI (100) sobre *G. mellonella* fue el que mayor producción presentó.
- Los primeros días son en los que mayor producción se presenta, es decir, entre el día 6 y 14, dependiendo del inóculo inicial utilizado.
- Si es posible que se desarrollen más de 2 generaciones de nemátodos entomopatógenos al interior de larvas de *G. mellonella*.
- La temperatura es de especial importancia tanto para el desarrollo como para la reproducción de NEPs.

10.- PERSPECTIVAS

- Monitorear la producción *in vitro* con distintos métodos y/o variantes del que utilizamos en el presente trabajo.
- Llevar un control sobre mortalidad de los JI almacenados de las distintas cepas, para conocer más acerca de estos.
- Llevar a cabo producción *in vitro* al menos con 2 distintos métodos para poder cuantificar y calcular que tan rentable y viables son los NEPs producidos por los distintos métodos tanto *in vivo*, como *in vitro*.

12.- ANEXOS

Dieta de *G. mellonella*

- Miel de abeja	97.5 mL
- Glicerol	120 mL
- Salvado de trigo (estéril)	37.5 g
- Cereal de arroz	300 g
- Levadura	75 g

Procedimiento:

1. Mezclar el cereal de arroz con el salvado estéril.
2. Agregar levadura y mezclar muy bien (Mezclar antes la miel con la glicerina y agregar a la mezcla).
3. A los ingredientes secos agregar poco a poco la mezcla del glicerol con miel, utilizando las manos.
4. Mezclar hasta obtener una mezcla homogénea.

13.- BIBLIOGRAFÍA

Abebe E., Jumba M., Bonner K., Gray V., Morris K., and Thomas W., (2010). An entomopathogenic *Caenorhabditis briggsae*. *Journal Experimental Biology* 213:3223– 3229.

Adams B., Fodor A., Koppenhöfer H., Stackebrandt E., Stock S., y Klein M., (2006). Reprint of “Biodiversity and systematics of nematode–bacterium entomopathogens” [Biol. Control 37 (2006) 32–49]. *Biological control*, 38(1), 4-21.

Akhurst R., (1980). Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. *J. Gen. Microbiol.* 121, 303–309. doi: 10.1099/00221287-121-2-303.

Akhurst R., (1982). Antibiotic activity of *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes of the families Heterorhabditidae and Steinernematidae. *Microbiology*, 128(12), 3061-3065.

Akhurst R., (1982). A *Xenorhabdus* sp. (Eubacteriales: Enterobacteriaceae) symbiotically associated with *Steinernema kraussei* (Nematoda: Steinernematidae). *Revue de Nematologie*. 5 (2):277-280.

Alatorre-Rosas R. y Kaya H., (1990). Interspecific competition between entomopathogenic nematodes in the genera *Heterorhabditis* and *Steinernema* for an insect host in sand. *Journal of Invertebrate Pathology*, 55(2), 179-188 Barboza-

Corona J. E., Bautista-Justo M. e Ibarra J. E. (1998). Actividad quitinolítica de *Bacillus thuringiensis* y su uso potencial en el control biológico de plagas. *Acta Universitaria*. 8 (1): 57-65.

Bathon H., (1996). Impact of entomopathogenic nematodes on non-target hosts. *Biocontrol Science and Technology*, 6(3), 421-434.

Bedding R., (1981). Low cost *in vitro* mass production of *Neoaplectana* and *Heterorhabditis* species (Nematoda) for field control of insect pests. Division of Entomology, CSIRO, Stowell Avenue, Hobart, Tasmania, 7000, Australia *Nematologica*, 27(1):109-114.

Bedding R., (1984). Large scale production, storage and transport of the insect-parasitic nematodes *Neoaplectana* spp. and *Heterorhabditis* spp. *Annals of applied biology*, 104(1), 117-120.

Bedding R. y Molyneux A., (1984). Influence of soil texture and moisture on the infectivity of *Heterorhabditis* sp. D1 and *Steinernema glaseri* for larvae of the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Nematológica*, 30(3), 358-365.

Boemare N. y Akhurst R., (1988). Biochemical and physiological characterization of colony form variants in *Xenorhabdus* spp.(Enterobacteriaceae). *Microbiology*, 134(3), 751-761.

Boemare N., Akhurst R. y Mourant R., (1993). DNA relatedness between *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae) symbiotic bacteria of the entomopathogenic nematodes, and proposal to transfer *Xenorhabdus luminescens* to a new genus, *Photorhabdus* gen. nov. *International Journal of System Bacteriology*. 43: 249 - 255.

Boff M., Wiegers G., Gerritsen L. y Smits P., (2000). Development of entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis megidis* strain NLH-E 87,3 in *Galleria mellonella*. *Nematology* 2: 303 - 308.

Boucias G., (1998). Principles of insect pathology. Kluwer Academic Publishers. London, UK. 537 pp.

Bowen D., Rocheleau T., Blackburn M., Andreev O., Golubeva E. y Bhartia R., (1998). Toxinas insecticidas de la bacteria *Photorhabdus luminescens*. *Science*, 280 (5372), 2129-2132.

Brillard J., Ribeiro C., Boemare N., Brehélin M. y Givaudan A., (2001). Two Distinct Hemolytic Activities in *Xenorhabdus nematophila* Are Active against Immunocompetent Insect Cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6), 2515-2525.

Brown I. y Gaugler R., (1996). Cold tolerance of steinernematid and heterorhabditid nematodes. *Journal of thermal biology*, 21(2), 115-121.

Brurberg M., Nes I., y Eijsink V., (1996). The chitinolytic system of *Serratia marcescens*. *Chitin Enzymology*. 2: 171-180

Campbell L. y Gaugler R., (1991). Mechanisms for exsheathment of entomopathogenic nematodes. *International Journal for Parasitology*, 21 : 219-221.

Campos-Herrera R., Escuer M., Labrador S., Robertson L., Barrios L. y Gutiérrez C., (2007). Distribución de los nemátodos entomopatógenos de La Rioja (norte de España). *Revista de patología de invertebrados*, 95 (2), 125-139.

Caspeta-Mandujano J. (2010). Nemátodos parásitos de peces de agua dulce de México: clave de identificación, descripción y distribución de las especies. AGT Editor.

Castillo C., Gallegos P. y Oña M. (2011). Manejo de nemátodos entomopatógenos en Laboratorio. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Estación Experimental Santa Catalina (EESC), Departamento Nacional de Protección Vegetal (DNPV). Panamericana Sur de Quito. 1. Quito, Ecuador.

Castagnola A. y Stock S., (2014). Factores comunes de virulencia y objetivos tisulares de bacterias entomopatógenas para el control biológico de plagas de lepidópteros. *Insectos*, 5 (1), 139-166.

Castro I., (2015). Nemátodos entomopatógenos en cultivos de caña de azúcar del estado de Morelos. Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM). Morelos, México.

Castro I., (2020) Aislamiento, identificación y evaluación de tres cepas de nemátodos entomopatógenos en cultivos de caña de azúcar en Morelos. Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM). Morelos, México.

Chavarría-Hernández N., Ortega-Morales E., Vargas-Torres A., Chavarría-Hernández J. y Rodríguez-Hernández A., (2010). Cultivo monoxénico sumergido del nematodo entomopatógeno, *Steinernema carpocapsae* CABA01, en un

biorreactor mecánicamente agitado: Evolución de las condiciones hidrodinámicas y de transferencia de masa. *Biotecnología e Ingeniería de Bioprosesos*, 15 (4), 580-589.

Cho S. y Kim Y., (2004). Hemocyte apoptosis induced by entomopathogenic bacteria, *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*, in *Bombyx mori*. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 7(2), 195-200.

Cocom M., (2014). Vitro para el control de plagas en cultivos hortícolas. Escuela Agrícola Panamericana. Zamorano. Estancia en la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Hidalgo, México.

De Ley P. y Blaxter M., (2002). Systematic position and phylogeny. In: Lee, D.L. (Ed.). *The biology of nematodes*. London nematodes. London, UK, Taylor & Francis, pp. 1-30.

Dunphy G. y Webster J., (1991). Antihemocytic surface components of *Xenorhabdus nematophilus* var. *dutki* and their modification by serum of nonimmune larvae of *Galleria mellonella*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 58(1), 40-51.

Dillman A., Chaston J., Adams B., Ciche T., Goodrich-Blair H., Stock S. y Sternberg P., (2012). An entomopathogenic nematode by any other name. *PLOS Pathogens*, 8(3).

Dunphy G. y Webster J., (1984). Interaction of *Xenorhabdus nematophilus* subsp. *nematophilus* with the haemolymph of *Galleria mellonella*. *Journal of insect physiology*, 30(11), 883-889.

Dunphy G. y Webster J., (1991). Antihemocytic surface components of *Xenorhabdus nematophilus* var. *dutki* and their modification by serum of nonimmune larvae of *Galleria mellonella*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 58 (1), 40-51.

Ehlers R., (2001). Producción en masa de nematodos entomopatógenos para la protección de las plantas. *Microbiología aplicada y biotecnología*, 56 (5-6), 623-633.

Escobar M., Carbonell G., Beriam L., Siquiera W. y Yano T., (2001). Cytotoxin production in phytopathogenic and entomopathogenic *Serratia marcescens*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 43(4):165-170.

Fernández E., Arteaga E. y Pérez M., (2019). Utilización de los nemátodos entomopatógenos en el control de plagas agrícolas. Laboratorio de Nematología. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV). Habana, Cuba. Disponible en:<http://www.aguascalientes.gob.mx/codagea/produce/NEMA-ENT.htm>. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV). Habana, Cuba. Disponible en:<http://www.aguascalientes.gob.mx/codagea/produce/NEMA-ENT.htm>.

Forst S., Dowds B., Boemare N. y Stackebrandt E., (1997). *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: bugs that kill bugs. Annual review of microbiology, 51(1), 47-72.

Freeman B., (1985). Microbiología de Burrows. Interamericana McGraw-Hill. México. 1181 pp.

Guerra Sierra B., Chacón J., Muñoz Flórez J. y Caicedo A., (2014). Evaluation of pathogenicity *Xenorhabdus* spp. natives in Colombia. Revista Colombiana de Biotecnología.

Gaugler R. y Campbell J., (1993). Nictation behaviour and its ecological implications in the host search strategies of entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae). Behaviour, 126(3-4), 155-169.

Gaugler R., Grewal P., Kaya H. y Smith-Fiola D., (2000). Quality assessment of commercially produced entomopathogenic nematodes. Biological Control, 17:100-109.

Grant J. y Villani M., (2003). Soil moisture effects on entomopathogenic nematodes. Environmental Entomology. 32(1):80-87.

Grewal P., Lewis E. y Gaugler R., (1997). Response of infective stage parasites (Rhabditida: Steinernematidae) to volatile cues from on effects hosts. Journal Chemical Ecology. 23:503-513.

Grewal P., Selvan S. y Gaugler, R. (1994). Nematodes: niche breadth for infection, establishment, and reproduction. Journal of Thermal Biology, 19, 245-53.

Grewal P., (2000). Mushroom pest. In: Lacey and H. K. Kaya, eds. Field Manual of techniques in vertebrate pathology. L. A. Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic publishers. 497-503.

Guadarrama T., (2018). Propagación del nemátodo entomopatógeno *Caenorhabditis brenneri*. Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM). Morelos, México.

Hara A., Lindegren J. y Kaya H., (1981). Monoxenic mass production of the entomogenous nematode *Neoplectana carpocapsae* Weiser on dog food / agar medium. USDA Advances in Agriculture Technology. AAT-W 0193-3736; 16.

Hazir S., Stock S., Kaya H., Koppenhöfer A. y Keskin N., (2001). Developmental temperature effects on five geographic isolates of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* (Nematoda: Steinernematidae). Journal of Invertebrate Pathology, 77(4), 243-250.

Hinchliffe S., Hares M., Dowling A. y French-Constan R., (2010). Insecticidal Toxins from the *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* Bacteria. The Open Toxinology Journal. 3: 83-100.

Hurst M., Glare T., Jackson T. y Ronson C., (2000). Plasmid-located pathogenicity determinants of *Serratia entomophila*, the causal agent of amber disease of grass grub, show similarity to the insecticidal toxins of *Photorhabdus luminescens*. Journal of Bacteriology, 182(18), 5127-5138.

Ishii K., Adachi T., Hamamoto H. y Sekimizu K., (2014). *Serratia marcescens* suppresses host cellular immunity via the production of an adhesion-inhibitory factor against immunosurveillance cells. Journal of Biological Chemistry, 289(9), 5876-5888.

Joyce S., Watson R. y Clarke D., (2006). La regulación de la patogenicidad y mutualismo en *Photorhabdus*. Opinión actual en microbiología, 9 (2), 127-132.

Kaya H. y Hara A., (1981). Susceptibility of various species of lepidopterous pupae to the entomogeneous nematode *Neoplectana carpocapsae*. Journal of Nematology. 13 (13), 91-294.

Kaya H., (1990). 5. Soil Ecology. *Entomopathogenic nematodes in biological control*, 93.

Kaya H. y Koppenhofer A., (1999). Biology of insecticides nematodes. En Polavarapu. (Ed). Optima use insecticidad nematodes in pest management (pp. 1-8). New brunswick, New Jersey, Rutgers University.

Kaya H. y Stock S., (1997). Techniques in insect nematology. In Manual of techniques in insect pathology (pp. 281-324). Academic Press.

Khush R. y Lemaitre B., (2000). Genes that fight infection: what the *Drosophila* genome says about animal immunity. Trends in Genetics, 16(10), 442-449.

Koppenhöfer A. y Fuzy E., (2007). Soil moisture effects on infectivity and persistence of the entomopathogenic nematodes *Steinernema scarabaei*, *S. glaseri*, *Heterorhabditis zealandica*, and *H. bacteriophora*. Applied Soil Ecology 35: 128-139.

Kwak Y., Khan A. y Shin J., (2015). Genome sequence of *Serratia nematodiphila* DSM 21420T, a symbiotic bacterium from entomopathogenic nematode. Journal of biotechnology, 193, 1-2.

Lang A., Schmidt G., Schlosser A., Hey T., Larrinua I., Sheets J. y Aktories K., (2010). *Photorhabdus luminescens* toxins ADP-ribosylate actin and RhoA to force actin clustering. Science, 327(5969), 1139-1142.

Lindegren J., Valero K. y Mackey B., (1993.) Simple *in vivo* production and storage methods for *Steinernema carpocapsae* infective juveniles. Journal of Nematology 25 (2): 193 - 197.

Luque S., (2000). Cultivation in vivo and method of storage for infective juveniles of *Steinernema feltiae* (Rhabdita: Stenernematide). Agronomía Colombiana.

Maldonado G. y PE209106 P., (2009). Manual de prácticas de parasitología con énfasis en helmintos parásitos de peces de agua dulce y otros animales silvestres de México. México.

McInerney B, Taylor W, Lacey M, Akhurst R. y Gregson R., (1991). Metabolitos biológicamente activos de *Xenorhabdus* spp., Parte 2. Derivados de benzopiran-1-ona con actividad gastroprotectora. *Journal of Natural Products*, 54 (3), 785-795.

Morton A., (2009). Los nemátodos entomopatógenos (Rhabditida: Steinernematidae y Heterorhabditidae) para el control del gusano cabezudo, *Capnodis tenebrionis* (Coleoptera: Buprestidae). Tesis Doctorado Zoología. Departamento Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología. Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Biociencias. Barcelona, España. 179 p.

Ogier J., Calteau A., Forst S., Goodrich-Blair H., Roche D., Rouy Z. y Médigue C., (2010). Units of plasticity in bacterial genomes: new insight from the comparative genomics of two bacteria interacting with invertebrates, *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. *BMC genomics*, 11(1), 568.

Ortiz E., Calvache G. y Luque E., (1994). Control microbiano de *Sagalassa valida*, Walker con el nematodo *Steinernema carpocapsae* (Weiser) en Tumaco, Nariño. *Palmas* 5 (1): 29 - 38.

Park Y. y Kim Y., (2000). Eicosanoids rescue *Spodoptera exigua* infected with *Xenorhabdus nematophilus*, the symbiotic bacteria to the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. *Journal of Insect Physiology*, 46(11), 1469-1476.

Park Y. y Kim Y., (2003). *Xenorhabdus nematophilus* inhibits p-bromophenacyl bromide (BPB)-sensitive PLA2 of *Spodoptera exigua*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, 54(3), 134-142.

Picoaga A., Abelleira A., Mansilla J. y Do Areeiro E., (2007). The entomopathogenic nematodes and their application for biological control of insect pests. *Viticultura Enología Profesional. Extraordinario* (España).

Poinar G., (1979). Nematodes for biological control of insects. CRC Press, Boca Raton, FL. Poinar, G. O. Jr., (1989). Non-insect host for the entomogenous rhabditide nematodes *Neoaplectana* (Steinernematidae) and *Heterorhabditis* (Heterorhabditidae). *Revue de Nématologie*, California, USA. 12, 423-428.

Poinar G., (1989). Non-insect host for the entomogenous rhabditide nematodes *Neoaplectana* (Steinernematidae) and *Heterorhabditis* (Heterorhabditidae). *Revue de Nématologie*, California, USA. 12, 423-428.

Poinar G., (1993). Orígenes y relaciones filogenéticas de los rhabdítidos entomofílicos, *Heterorhabditis* y *Steinernema*. *Nematología fundamental y aplicada*, 16 (4), 333-338.

Pye A. y Burman M., (1981). *Neoaplectana carposapsae*: nematode accumulations in Chemical and bacterial gradients. *Experimental Parasitology*. 51: 13-20.

Realpe A., Bustillo P. y López N. (2007). Optimización de la cría de *Galleria mellonella* (L.) para la producción de nematodos entomopatógenos parásitos de la broca del café. *Cenicafé* 58(2):142-157.

Ribeiro C., Duvic B., Oliveira P., Givaudan A., Palha F., Simoes N. y Brehélin, M. (1999). Insect immunity – effects of factors produced by a nematobacterial complex on immunocompetent cells. *Journal of insect physiology*, 45(7), 677-685.

Rodou, A., Ankrah, D. O., y Stathopoulos, C. (2010). Toxins and secretion systems of *Photorhabdus luminescens*. *Toxins*, 2(6), 1250-1264.

Sáenz A., (2005). Importancia de los nemátodos entomopatógenos para el control biológico de plagas en palma de aceite. *Palmas*, 26(2): 41-57.

Sáenz A. y López J., (2011). Ciclo de vida y patogenicidad del aislamiento nativo *Heterorhabditis* sp. SL0708 (Rhabditida: Heterorhabditidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 37(1), 43-47.

Saunders J. y Webster J., (1999). Temperature effects on *Heterorhabditis megidis* and *Steinernema carpocapsae* infectivity to *Galleria mellonella*. *Journal of Nematology*, 31(3): 299-304.

Shapiro-Ilan DI. y Gaugler R., (2002). Tecnología de producción para nemátodos entomopatógenos y sus simbioses bacterianos. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28 (3), 137-146.

Shapiro-Ilan D., Gaugler R. y Lewis E., (2004). *In vivo* production of entomopathogenic nematodes. *International Journal of Nematology*, 14 (1): 13-18.

Shapiro-Ilan D., Bruck D. y Lacey L., (2012). Principles of epizootiology and microbial control. *Insect pathology*, 2, 29-72.

Shapiro-Ilan DI., Han R. y Qiu X., (2014). Producción de nemátodos entomopatógenos. En producción en masa de organismos benéficos (pp. 321-355). Prensa Académica.

Smart G., (1995). Entomopathogenic nematodes for the biological control of insects. *Journal of Nematology*, 27:529-534.

Smart y Nguyen, (1994). Role of entomopathogenic nematodes in biological control. En: Rosen, D., Bennet, F. D. y Capinera, J. L. (Eds.) *Pest management in the subtropics: Biological control a Florida perspective*. 231-252, UK, Andover intercept.

Snyder H., Stock S., Kim S., Flores-Lara Y. y Forst S., (2007). Nuevos conocimientos sobre los procesos de colonización y liberación de *Xenorhabdus nematophila* y la morfología y ultraestructura del receptáculo bacteriano de su huésped nematodo, *Steinernema carpocapsae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (16), 5338-5346.

Stainer R., Ingraham J., Wheelis M. y Painter P., (1994). *The Microbial World*. Fifth Edition. Prentice may. New Jersey, USA. 689 pp.

Stock S. y Goodrich-Blair H., (2012) Nematode parasites, pathogens and associates of insects and invertebrates of economic importance. En: Manual of techniques in invertebrate pathology. Ed: Lawrence A. Lacey. 2ª edición Academic Press, Elsevier. pp: 373-426.

Thomas G. y Poinar G., (1979). *Xenorhabdus* gen. Nov., a genus of entomopathogenic nematophilic bacterial of the family Enterobacteriaceae, International Journal of systematic Bacteriology. 29: 352-360.

Torrini G., Mazza G., Carletti B., Benvenuti C., Roversi P., Fanelli E., Luca F., Troccoli A. y Tarasco E., (2015). *Oscheius* Description of six new species of *Oscheius andrassy*, (1976). (Nematoda: Rhabditida) from Pakistan 161 *O. onirici* sp. n. (Nematoda: Rhabditidae): a new entomopathogenic nematode from an Italian cave. Journal Zootaxa, 26:533-548.

Waterfield N., Bowen D., Fetherston J. y Perry R., (2001). Los genes tc de *Photorhabdus*: una familia en crecimiento. Tendencias en microbiología, 9 (4), 185-191.

Woodring J. y Kaya H., (1988). Steinernematid and Heterorhabditid Nematodes: a handbook of techniques. South Coop. Ser Bull. Arkans. Agricultural Experiment Station Fayetteville. 31: 1 -130. 249. USA.

Zhang C., Liu J., Xu M., Sun J., Yang S., An X., Gao G., Lin M., Lai R., He Z., Wu Y. y Zhang K., (2008). *Heterorhabditoides chongmingensis* gen. nov., sp. nov. (Rhabditida: Rhabditidae), a novel member of the entomopathogenic nematodes. Journal Invertebrate Pathology 98: 153-168.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

DES de Ciencias Naturales
Doctorado en Ciencias Naturales



Cuernavaca, Morelos, a 19 de octubre del 2023.

VOTOS APROBATORIOS DE TESIS

Los integrantes de la Comisión Revisora de la tesis titulada: **“Ciclo de vida *in vivo* de tres especies de nematodos entomopatógenos nativas del estado de Morelos y su producción”**, que presenta la **C. Tania Marel Guadarrama Ávila**, del Programa de Posgrado Doctorado en Ciencias Naturales, bajo la dirección del DR. VÍCTOR MANUEL HERNÁNDEZ VELÁZQUEZ, han determinado que el documento reúne los requisitos académicos para su defensa oral en el examen de grado, por lo que emiten su **VOTO APROBATORIO**.

Comisión Revisora de tesis (firma electrónica)

DR. VICTOR MANUEL HERNANDEZ VELAZQUEZ (CEIB UAEM)

DR. GUADALUPE PEÑA CHORA (CIB UAEM)

DR. JOSE AUGUSTO RAMIREZ TRUJILLO (CEIB UAEM)

DR. IVÁN ARENAS SOSA (IBT UNAM)

DR. VICTOR LOPEZ MARTINEZ (FCA UAEM)

DRA. LILIANA AGUILAR MARCELINO (CENID-INIFAP)

DRA. MARY CARMEN TORRES QUINTERO (CCG UNAM)



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

IVÁN ARENAS SOSA | Fecha:2023-11-13 12:58:42 | Firmante

qmA8gGSrg9BTEmy2aHcFmFTSelCKuKEH5MfOobLvJiAU00KpDZRgP+s2leMuKuZoacmyUwS8T0hUxdlsfa3611FwwPeDr1vsl3dw1GyibIGWTQnRElFVRT1LSJ6F9EluPydyz57tvBlm62/oO4kzAVq2kbAeGStz+NFIsIKMlf4H7O40pPFLu+Exhphvg4cKJus2soz117kHuPqy7IL6u/mS2ifDqIN2SRFuwPd+1y0JB3SjMSAO1YacFc14i5c4nJQcv9Xjls8AUsl/IsVcnTm+rN3QZ72aeThBRrT9oLsduk4Q1ojaO5Agc56HG5s+9grWbPky10TVePwPkeg==

GUADALUPE PEÑA CHORA | Fecha:2023-11-13 13:02:32 | Firmante

TkuH7T3xuu9XjyVoPJ+LJUuw9VY1N21bDBy6jFbdppcm+KhP4WtqnFQJArS+YXOOJzN5JsNnw+MzzvUv8tY2XxudyM+LPe6aB5T+OEJt799KCeZHMnzfHJKZTrM//Xej4KWVb sqOMONzC8toSQ3qXZtAT247PKQIB33YaDS1ZmnuDT0GAia0smjSOEdmJ83BCv09NIT1x9XxVKUg+NMhvbCc0w0HpwKZPEVW7EuQJppfdHXrV06Br65rbwZDazLORTN0qV3j1Bpmsol/YWS10+xG/k+ISPKReDoXIRTG4emlbr08/bAmD2ZBW7wvo55iHcrMzg327su68PWxPA==

JOSE AUGUSTO RAMIREZ TRUJILLO | Fecha:2023-11-13 13:07:32 | Firmante

VULCcaVmJt7fwGilbF+rW18oh+ACq23QqHSDVnSfpgy1ttfwCWcYJs50gmpXGECMICQ/I9doFJcvzbiqQMI6tbDQKZmNEqPZdHjy0z+YCrNoozRM4sDHW9kxYR4BGfgq+ONko6Ftjwp5m2POK6CHo9arpkb9zRqwVGnruDXle49TEGpd+UKnkC23q+MWqhGose7854Tg0IRY7/xasmd8Ad46ueiyk14QXifSE1LhNY5eGXSS913IOpcXBcDfTIKf7NLnBC2xk6V VzL/u1ko62yFK1Usq1A/pOoFqbkM8rSpjoi8Dc5gsXEpKrRzrlznfoulKNWAXde0VJFko+Zkg==

VICTOR MANUEL HERNANDEZ VELAZQUEZ | Fecha:2023-11-13 13:30:59 | Firmante

fYz9U+HWx3s04/G8lhqgM717kpEYw5S1gm+XGC+TEGYBA79Rkbb0JEXngsDZ5G8n7Tn39/M3S4CRf2ChCJc6icF9+blD/S/f8UMQ18+5MJty2IMX7qNbQhf2BD+ilbFnePAYs6AvDgPpXsCKVJrb7WSptdtHMT6wumVifmsIP6ufy4ohPUuJKi9n1cx2SjvVeEJ9yxqOjim1glyZ/HGj8DLGPNuQ96U81V68BclD9RgY7f6Toulsb8P4hfn9VrL9YK9ON+Gfu8nDHI6FDLuvL1s9WiAy67RXD3XNCoUopgpP1pH7xZtWg8O5GQdMhObFmc7nhPcHLOgCE7UHyy==

MARY CARMEN TORRES QUINTERO | Fecha:2023-11-13 14:07:24 | Firmante

aFRgoYxFDNMT21W5oQkoJJMONpqjGpXLclLPIxm1UkvahpNrAhIAjigO6456s9h89e07VjvUJ0CpjuwAfwjRoiJRGKwfwzfy7ITJZ6gVGLg0IbMsrnNuwxPDZsPhimMd3Qhw4gN or08dh0DvrB+EBpYGSdZvmi4POc+Rotm0fPat3tiXbHxvi8/NQ6hst9+Lz2QojP3jtkC4CRyQjDF0ko5kOq3oUE436lWIP99TzQv0m6qsFHbabRKUCpxskt130+GwA/kR2ha3qObdZGMhZFslnEG0cqdAO301F05b0eaMA609vjDy7SWDkdjkjfcvlaA9cLjcm1y06KDiCOQ==

LILIANA AGUILAR MARCELINO | Fecha:2023-11-13 21:12:01 | Firmante

By4VUaoWB2sA+GwjXlJgkOH4EWPq55JGmnGWY/ajg3sFeXltdG7CyWxakhAjBdawG5F03+xG38aX1HzDi914F3r1j8wK8NbM48j3FzOmFhgaw/X/L06bdyRcXriahteh+/XOSA LpAXZUBI7OZDuCRE3kf9bKnbBsis0d6lWnOlxgHltZu709vxCrbmTJ65fzgzV5u1a3RJYTNuFyJbJNM1R6UJKPZ+4FYRsh+2MIED4cC/VZMubdYMD/to7cMexbFqQldt9O5kuzGm ggSdAEqUuJgZ0X4zBF8ph8GIKfX1UISf51btSle+ceUiuVAOxrcA82rmsPz+93Z28RSg4rA==

VICTOR LOPEZ MARTINEZ | Fecha:2023-11-16 22:39:06 | Firmante

O+NG8DQRgskcNzK7m99zg4molAs+aw47xhp2DZVWS0pJgDogRk3Up9JTpc0Ou7ZKQwW3fwul1+j2bKwX8iVQ3UqSt5JYei54s11g0ilqQHCR3i3dZEM8SivRDyGUfly+mfakGsUv28R33LOBLXtjkkbDoc0lb3vfW5vBjfrmiDzNtzRqh89oYLvrH/CqVYeYgBp9en1aM+1YapBnTuRUeEqD13LxEBV58BvxBPXaziaNs0zcd1qyN9MkMorsxhOmlhIASdGNPwEUs36QMyy/zyCE7zSR2s6qxW8R1b4I7DQC65jc7a3cgLRTwOQ5RuohclekeMAstXdDr4MEQ==

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



5f80WJoGA

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/HkcO3AscufhCqkYx6iPpstoWtv8k8zrk>

