



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**Localización de *Serratia marcescens* en el tracto intestinal del
nematodo entomopatógeno *Oscheius myriophila***

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A:

Biol. Yareli Jaime Maldonado

DR. VÍCTOR MANUEL HERNANDEZ VELAZQUEZ

DIRECTOR DE TESIS

DRA. MARY CARMEN TORRES QUINTERO

CO-DIRECTOR DE TESIS

CUERNAVACA, MORELOS

ABRIL, 2026



Dedicatoria

A mis padres, por su amor incondicional, su apoyo constante y por enseñarme, con su ejemplo, a perseverar incluso en los momentos más complejos.

A quienes han caminado a mi lado en este proceso, por su valiosa compañía, su paciencia en los momentos difíciles y por su presencia a lo largo de este camino.

“La paciencia todo lo alcanza.” — Teresa de Ávila

Agradecimientos

A mi director de tesis el Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez, por abrirme las puertas del laboratorio y brindarme la oportunidad de desarrollarme en este espacio académico. Agradezco profundamente su apoyo, orientación y disposición durante este proceso.

A la Dra. Mary Carmen Torres Quintero, por su guía, dedicación y compromiso a lo largo de este trabajo. Su acompañamiento constante, sus enseñanzas y su confianza fueron fundamentales para el desarrollo y culminación de esta investigación.

A los miembros de mi comité evaluador, Dr. Guadalupe Peña Chora, M. en C. Laura Patricia Lima García y Dr. Erubiel Toledo Hernández por sus valiosas observaciones, tiempo y contribuciones que enriquecieron este trabajo.

A la M. en C. Stefany Argueta, al Dr. Víctor González, al Dr. Pablo Vinuesa, a la M. en C. Rosa Isela Santamaría Gutiérrez y al Biól. Alan Alejandro Aguayo González, por su apoyo, colaboración y disposición durante el desarrollo experimental, así como por las facilidades brindadas en el uso de equipos e instalaciones.

A los integrantes del Laboratorio de Control Biológico, por el apoyo brindado, el compañerismo y el ambiente de trabajo que contribuyó al desarrollo de este proyecto, en especial a Ximena, Betsabé y Amahirani, así como a la M. en B. Alicia Fonseca.

Índice

Resumen	8
Introducción	9
2. Antecedentes	10
2.1. Nematodos entomopatógenos	10
2.1.1. Morfología de los nematodos entomopatógenos.....	11
2.1.2. Ciclo de vida de los nematodos entomopatógenos.....	11
2.1.3. Importancia en el Control Biológico	13
2.2. Familia <i>Heterorhabditidae</i>	13
2.3. Familia <i>Steinernematidae</i>	14
2.4. Nematodos nativos del Estado de Morelos.....	15
2.4.1. <i>Oscheius myriophila</i>	16
2.5. Interacción Nematodo – Bacteria.....	17
2.6. Bacterias Entomopatógenas	18
2.7. Mecanismos de acción de las bacterias <i>Xenorhabdus sp.</i> y <i>Photorhabdus sp.</i>	20
2.8. Bacterias aisladas de los nematodos nativos del Estado de Morelos	21
2.9. Género <i>Serratia</i>	21
2.10. Localización de las bacterias en los Nematodos entomopatógenos	22
3. Justificación	24
4. Hipótesis	25
5. Objetivo General.....	25
6. Objetivos específicos	25
7. Materiales y Métodos.....	26
7.1. Obtención del nematodo <i>Oscheius myriophila</i>	26
7.2. Cepas bacterianas	26
7.3. Purificación del vector pSVA337R (mCherry) y pSVA337(GFP)	27
7.4. Digestión del vector pSVA337R (mCherry) y pSVA337(GFP).....	27
7.5. Obtención de la cepa MC5-R transformada con el vector pSVA(337/337R).....	28
7.5.1. Método de Electroporación	28
7.5.2. Conjugación.....	29
7.6. Estabilidad del vector pSVA dentro de la bacteria MC5-R.....	29
7.7. Obtención de un cultivo axénico del nematodo <i>Oscheius myriophila</i>	30

7.8.	Localización de la cepa MC5-R en el nematodo <i>Oscheius myriophila</i>	30
7.8.1	Inmovilización del nematodo <i>Oscheius myriophila</i>	31
7.8.2	Fijación del nematodo <i>Oscheius myriophila</i>	32
7.9.	Bioensayos de patogenicidad de la cepa MC5-R (337/337R).....	33
7.10.	Bioensayos de patogenicidad del nematodo axénico <i>Oscheius myriophila</i> y alimentado con su bacteria simbiote	33
7.11.	Secuenciación del genoma de la cepa MC5-R	34
7.12.	Propagación del nematodo <i>Oscheius myriophila</i>	34
7.11.1	Propagación del nematodo <i>Oscheius myriophila</i> in vivo	34
7.11.2	Propagación del nematodo <i>Oscheius myriophila</i> in vitro.....	34
8.	Resultados	35
8.1.	Digestión del vector pSVA337R (mCherry) y pSVA337(GFP).....	35
8.2.	Fluorescencia de la cepa MC5-R nativa.....	37
8.3.	Obtención de la cepa MC5-R con el vector pSVA(337/337R).....	37
8.3.1.	Electroporación.....	38
8.3.2.	Selección de clonas conjugantes: importancia del antibiograma.....	38
8.3.3.	Conjugación.....	39
8.3	Estabilidad del vector pSVA dentro de la bacteria MC5-R.....	44
8.4	Inmovilización del nematodo <i>Oscheius myriophila</i>	45
8.5	Localización de la cepa MC5-R en el nematodo <i>Oscheius myriophila</i>	46
8.6	Bioensayos de patogenicidad de la cepa MC5-R (337/337R).....	54
8.7	Secuenciación del genoma de la cepa MC5-R	56
8.8	Obtención de un cultivo axénico del nematodo <i>Oscheius myriophila</i>	59
8.9	Evaluación de la patogenicidad del nematodo <i>Oscheius myriophila</i>	60
8.10	Propagación del nematodo <i>Oscheius myriophila</i> in vivo e in vitro	61
9.	Discusión.....	64
10.	Conclusiones	68
11.	Literatura.....	70
12.	Anexos	76

Índice de Figuras

Figura 1. Morfología de los nematodos entomopatógenos macho y hembra.....	11
Figura 2. Ciclo de vida de los nematodos en hospederos.....	12
Figura 3. Diente dorsal (A) de los infectivos juveniles de la familia <i>Heterorhabditidae</i>	14
Figura 4. Bacteria <i>Xenorhabdus nematophila</i> colonizando la vesícula del nematodo <i>Steinernema carpocapsae</i>	15
Figura 5. Mecanismo de acción de <i>Xenorhabdus sp.</i> y <i>Photorhabdus sp.</i>	20
Figura 6. Vector pSVA	36
Figura 7. Vector pSVA..	36
Figura 8. Prueba de fluorescencia de la cepa MC5-R.....	37
Figura 9. Antibiograma.....	39
Figura 10. Resultados de la conjugación en diferentes medios.....	40
Figura 11. Clonas de la conjugación.....	41
Figura 12. Clonas MC5-R 337 (GFP).....	41
Figura 13. Clonas MC5-R 337R (mCherry)	42
Figura 14. Clonas de la cepa MC5-R que tienen el vector pSVA337R (mCherry) comparadas con la cepa MC5-R nativa	43
Figura 15. Clonas de la cepa MC5-R que tienen el vector pSVA337 (GFP) comparadas con la cepa MC5-R nativa.....	43
Figura 16. Nematodos alimentados con la cepa MC5-R337R (mCherry) y silvestre.....	47
Figura 17. El nematodo <i>O. myriophila</i> alimentado con la cepa MC5-R 337 e inmovilizado en Agarosa al 10% en el microscopio de fluorescencia a 40X.....	48
Figura 18. Nematodo <i>O. myriophila</i> alimentado con la cepa MC5-R 337 y fijado con formol salino al 4% en el microscopio de fluorescencia a 40X.....	49
Figura 19. El nematodo <i>O. myriophila</i> alimentado con la cepa MC5-R nativa e inmovilizado en Agarosa al 10% en el microscopio de fluorescencia a 40X.	50
Figura 20. El nematodo <i>O. myriophila</i> alimentado con la cepa MC5-R 337 e inmovilizado en Agarosa al 10% en el microscopio de fluorescencia a 40X.....	51
Figura 21. El nematodo <i>O. myriophila</i> alimentado con la cepa MC5-R nativa e inmovilizado en Agarosa al 10% en el microscopio de fluorescencia a 40X.	52
Figura 22. El nematodo <i>O. myriophila</i> alimentado con la cepa MC5-R 337R e inmovilizado en Agarosa al 10% en el microscopio de fluorescencia a 40X.	53
Figura 23. El nematodo <i>O. myriophila</i> alimentado con la cepa MC5-R nativa e inmovilizado en Agarosa al 10% en el microscopio de fluorescencia a 40X.	54
Figura 24. Gel de Agarosa de la extracción de ADN de la cepa MC5-R tomada con el G: Box transiluminador.	56
Figura 25. ANI de la cepa MC5-R.....	57
Figura 26. Árbol filogenético de la cepa MC5-R.....	58

Índice de tablas

Tabla 1. Bacterias asociadas a nematodos entomopatógenos.....	19
Tabla 2. Bacterias transformadas con proteínas fluorescentes.....	23
Tabla 3. Propagación del nematodo <i>Oscheius myriophila</i> con un inóculo inicial de 100JI con diferentes métodos.....	62
Tabla 4. Propagación del nematodo <i>Oscheius myriophila</i> con un inóculo inicial de 500JI con diferentes métodos.....	62
Tabla 5. Propagación del nematodo <i>Oscheius myriophila</i> con un inóculo inicial de 1000JI con diferentes métodos.....	62

Índice de Gráficas

Grafica 1. Estabilidad de las clonas de la cepa MC5-R con el vector pSVA.	44
Grafica 2. Porcentaje de mortalidad de los nematodos con diferentes técnicas de inmovilización a la exposición de la luz del microscopio óptico a distintos tiempos.	46
Grafica 3. Porcentaje de mortalidad \pm Desviación Estándar de los bioensayos de patogenicidad por inyección a las 24 y 48 horas a una dosis de 105 células/larvas.	55
Grafica 4. Numero de NEPs producidos en diferentes métodos \pm Desviación Estándar a diferentes concentraciones de JI.	63

Resumen

La localización de la bacteria simbiote dentro del nematodo entomopatógeno es un factor clave que determina la eficacia en el control biológico de insectos plaga. Esta relación bacteria- nematodo es de importancia para que el nematodo pueda transportar y liberar su bacteria simbiote en el momento y lugar adecuados para iniciar la infección en el hospedero. En los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis*, la bacteria (*Xenorhabdus* spp. o *Photorhabdus* spp.) se aloja de manera estratégica en el intestino o en un saco especializado del nematodo también llamado vesícula. Esta localización permite que la bacteria permanezca viable y protegida hasta que el nematodo penetra el cuerpo del insecto, asegurando una liberación inmediata dentro del hemocele. Gracias a esta sincronía, el proceso de patogenicidad se desarrolla de forma rápida y eficaz, generando septicemia y la muerte del insecto en 24 a 72 horas.

En el presente estudio se identificó y caracterizó la cepa simbiote *Serratia marcescens* asociada al nematodo *Oscheius myriophila*. La identidad de la cepa bacteriana fue confirmada mediante secuenciación genómica, lo que permitió corroborar su asociación específica con el nematodo. Adicionalmente se evaluó la localización de *S. marcescens* en el tracto intestinal de *O. myriophila* utilizando las proteínas fluorescentes GFP y mCherry. Esta técnica, ampliamente reconocida en estudios de localización bacteriana, permitió visualizar la distribución de la bacteria a lo largo de todo el tracto intestinal del nematodo, confirmando su presencia y colonización estable.

Los hallazgos obtenidos demuestran que *Serratia marcescens* es un componente fundamental para que *Oscheius myriophila* pueda desarrollar su capacidad entomopatógena. La liberación de esta bacteria en *Galleria mellonella* provoca septicemia y la muerte del mismo en un periodo de 24 a 72 horas, evidenciando su rol determinante en el proceso de infección.

Estos resultados resaltan la relevancia de comprender con precisión tanto la localización como la dinámica de liberación bacteriana en el nematodo, ya que esta información es clave para optimizar la selección de cepas y especies de nematodos entomopatógenos. En consecuencia, se fortalece su aplicación como agentes de control biológico, constituyendo una alternativa sustentable frente a métodos químicos de manejo de plagas.

Introducción

Los nematodos entomopatógenos son organismos en forma de gusanos redondos no segmentados (Cubillas y Flores, 2016), con diferentes estilos de vida en los que destacan los parásitos obligados de un gran número de especies de insectos (Poinar, 1979; Kaya y Hara, 1981). La importancia de estos microorganismos radica principalmente en su utilización como agentes de control biológico de plagas de importancia económica. El interés por estos organismos se debe a que son vectores de transmisión de bacterias entomopatógenas las cuales les confieren distintos grados de virulencia y, por otro lado, la capacidad de tolerar variaciones del medio ambiente como: pH, salinidad, humedad, porosidad y composición química (Akhurst, 1986; Georgis y Poinar, 1993; Fujie y Yokoyama, 1998). El estudio de estos organismos en el control biológico ha permitido seleccionar cepas de nematodos que son capaces de tolerar y establecerse en distintas condiciones ambientales, por ejemplo, *Steinernema feltiae* y *Heterorhabditis megidis* son tolerantes a temperaturas frías del suelo, mientras que especies aisladas de regiones cálidas como *S. riobrave*, pueden tolerar exposiciones cortas a 42°C (Baker y Capinera, 1997).

La mayoría de estas cepas de nematodos pertenecen a las familias *Heterorhabditidae* y *Steinernematidae* (Kaya y Gaugler, 1993) y una de las principales características de estas familias es que forman asociaciones simbióticas con bacterias del género *Photorhabdus* y *Xenorhabdus*, de igual manera, existen algunos reportes de nematodos que pueden establecer asociaciones simbióticas con otras especies bacterianas, como *Serratia* (Kaya y Gaugler, 1993; Cuthbertson *et al.*, 2003; Picoaga *et al.*, 2007; France *et al.*, 2013). En este sentido, varios estudios han demostrado que las bacterias se localizan principalmente en el tracto intestinal del nematodo, por ejemplo, en los nematodos pertenecientes a la familia *Heterorhabditidae* las bacterias del género *Photorhabdus* se localizan en todo el tracto intestinal en comparación con los nematodos de la familia *Steinernematidae*, en donde las bacterias del género *Xenorhabdus* se localizan en una vesícula que se encuentra principalmente en la región anterior del intestino, cerca de la boca (González, 2006; Dunphy y Thurston, 1990; Ciche *et al.*, 2006).

En los últimos años, el Laboratorio de Control Biológico del Centro de Investigación en Biotecnología (UAEM) se ha dedicado a la búsqueda e identificación de nematodos entomopatógenos con potencial para el control de plagas en cultivos de importancia agrícola, en el 2020 Castro y colaboradores identificaron el nematodo *Oscheius myriophila* y Guadarrama y colaboradores en el 2024 evaluaron su patogenicidad, su capacidad infectiva y su reproducción en vivo. Aunado a ello también se aisló su bacteria simbionte la cual se identificó como *Serratia sp.* (Cruz, 2018). En este sentido, este trabajo pretende aportar información de la distribución de la bacteria *Serratia sp.* dentro del nematodo *Oscheius myriophila* e identificar la especie de *Serratia* asociada a este nematodo.

2. Antecedentes

2.1. Nematodos entomopatógenos

Los nematodos entomopatógenos (NEPs) son organismos en forma de gusanos redondos, no segmentados, son de vida libre, predadores y parásitos; entre los parásitos de insectos hay 30 familias de nematodos que están asociadas, siendo 7 las consideradas con potencial como agentes de control biológico: *Mermithidae*, *Allantonematidae*, *Neotylenchidae*, *Sphaerularidae*, *Rhabditidae*, *Steinernematidae* y *Heterorhabditidae* (Cubillas y Flores, 2016; Stock y Goodrich-Blair, 2012).

El uso de nematodos entomopatógenos constituye una alternativa ambiental y segura para el combate de plagas en cultivos de importancia económica, principalmente en aquellas que habitan o pasan parte de su ciclo biológico en el suelo. Las infecciones por estos patógenos pueden ocasionar la caída abrupta de las poblaciones de insectos en un corto plazo. La introducción y liberación aumentativa es utilizada de manera efectiva para mejorar el control biológico de plagas agrícolas como medidas alternativas a los productos químicos en una gran cantidad de países (Coupland *et al.*, 2017). Una de las características más relevantes dentro del grupo de los nematodos entomopatógenos, es que estos suelen establecer relaciones simbióticas con una o más

especies de bacterias. Dentro de los NEPs las familias *Steinernematidae* y *Heterorhabditidae* son las más estudiadas y utilizadas en el control biológico (Kaya y Gaugler, 1993).

2.1.1. Morfología de los nematodos entomopatógenos

Los NEPs poseen un sistema excretor, nervioso, digestivo, reproductivo y muscular completo. Sin embargo, carecen de un sistema circulatorio y respiratorio. Su tracto alimenticio consta de una boca seguida por una cavidad bucal (estoma), el esófago, intestino, recto y por último el ano (Fimbres y Flores, 2016).

Los sexos dentro de los NEPs suelen estar separados, los machos tienen uno o dos testículos y poseen unas espículas cercanas a la región anal, que utilizan como estructuras copuladoras; por otro lado, las hembras tienen uno o dos ovarios con la vulva ubicada ventralmente y cerca de la mitad del cuerpo (Stock y Goodrich, 2012).

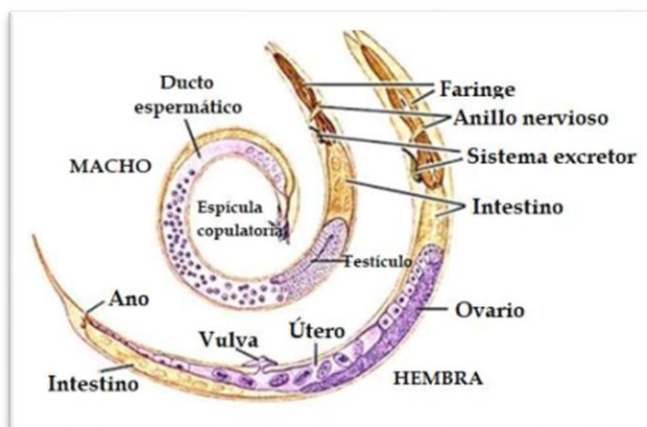


Figura 1. Morfología de los nematodos entomopatógenos macho y hembra (Grifaldo, 2010).

2.1.2. Ciclo de vida de los nematodos entomopatógenos

El ciclo de vida de los NEPs consta de diversas etapas, comenzando por huevo, juvenil y finalizando con la etapa adulta. La etapa juvenil consta de cuatro estadios: el estadio juvenil 1, 2 y 4 se desarrollan dentro del insecto hospedero y el estadio 3, llamado juvenil infectivo (JI) es de vida libre, siendo este último el encargado de buscar un nuevo hospedero (Picoaga *et al.*, 2007).

Los JIs después de salir del hospedero pueden ser asechadores o buscadores dependiendo de la especie, una vez que encuentran a su hospedero lo penetran a través de los orificios naturales, como son la boca, ano y espiráculos. Una vez que el nematodo ha logrado establecerse dentro del hospedero, este se dirige al hemocoele y libera las bacterias, finalmente después de 48h aproximadamente muere. Después de este tiempo, los nematodos se siguen desarrollando hasta llegar a la etapa adulta y comienzan a reproducirse dentro del cadáver del hospedero; cuando los nutrientes se terminan los JIs ingieren nuevamente las bacterias y abandonan el cadáver del hospedero terminando su ciclo y buscando nuevos hospederos para comenzar un ciclo nuevo (Figura 2) (Poinar, 1993; Kaya y Gaugler, 1993; Picoaga *et al.*, 2007; Cubillas y Flores, 2016).

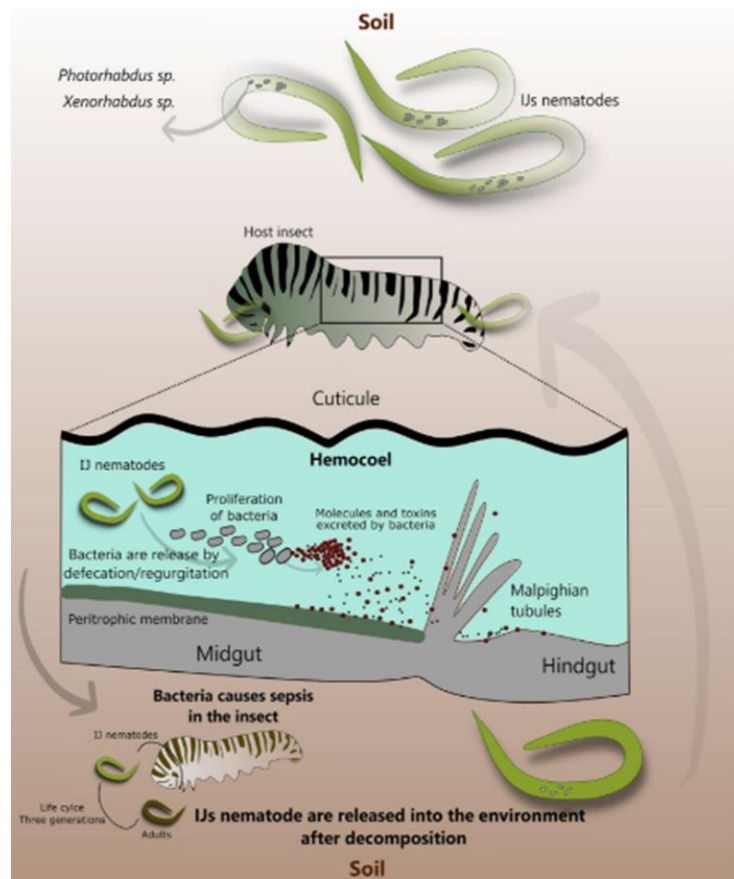


Figura 2. Ciclo de vida de los nematodos en hospederos (Wellington *et al.*, 2020).

2.1.3. Importancia en el control biológico

Los NEPs han sido utilizados principalmente como agentes de control biológico debido a las características benéficas que poseen, como son: la virulencia, el potencial reproductivo y la tolerancia al medio ambiente, aunque estas características pueden variar significativamente incluso entre cepas de la misma especie (Cuthbertson *et al.*, 2003). Actualmente existen algunas especies comerciales como *S. carpocapsae* y *S. feltiae* las cuales tienen un rango amplio de hospederos, así como tolerancia a la aplicación de algunos pesticidas (Ramos *et al.*, 2006; Polack *et al.*, 2020). Algunas de las ventajas de los NEPs en comparación con los pesticidas químicos es que son móviles y pueden buscar su hospedero, no causan daño al ser humano ni al medio ambiente (Selcuk, 2001) y causan la muerte del hospedero en 1 o 2 días ya que trabajan en conjunto con sus bacterias simbiotas (García, 2009; Fernández *et al.*, 1997).

Los NEPs se han utilizado principalmente como agentes de control biológico en el suelo ya que la mayoría de los insectos plaga habitan o pasan parte de su ciclo biológico en el suelo (Polack *et al.*, 2020). Sin embargo, también existen reportes de aplicaciones foliares de *S. feltiae* que han sido exitosas para controlar al gusano minador *Liriomyza brensis* (Cuthbertson *et al.*, 2003). También se ha demostrado que son muy eficientes para el control de los gorgojos *Otorhynchus sulcatus* (arándanos) y *Diaprepes abbreviatus* (cítricos), *Cosmopolites sordidus* (bananos), *Daprepes abbreviatus* y *Phyllophaga spp* (caña de azúcar) (Shapiro *et al.*, 2003; García, 2009).

2.2. Familia *Heterorhabditidae*

Los nematodos de esta familia son parásitos obligados de insectos y se relacionan con la bacteria simbiótica *Photorhabdus spp*. Las hembras adultas de la primera generación pueden ser hermafroditas. Los juveniles infectivos normalmente mantienen la cutícula del segundo estadio juvenil, lo cual se debe a que en el estado pre-infectivo no muda cuando no hay suficientes nutrientes, por lo que el juvenil infectivo presenta una doble cutícula que lo protege de factores ambientales adversos y aumenta su virulencia. La cabeza presenta un

diente dorsal prominente el cual les ayuda a penetrar la cutícula y llegar al interior del hospedero (Figura 3) (De- Jun *et al.*, 2001; Stuart y Gaugler 1994).

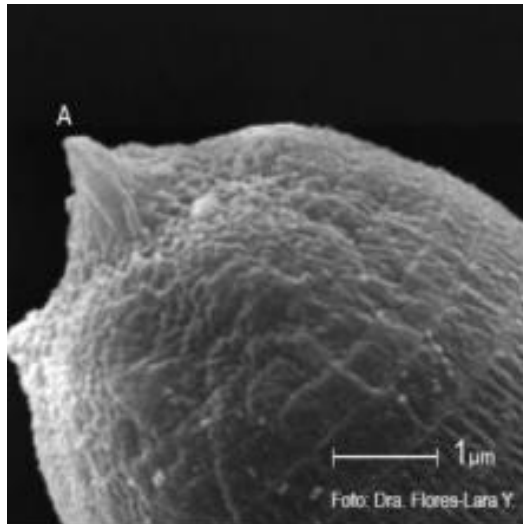


Figura 3. Diente dorsal (A) de los infectivos juveniles de la familia *Heterorhabditidae* ayuda a penetrar al interior del insecto hospedero por las membranas inter segmentales (Fimbres y Flores, 2016).

Uno de los nematodos más estudiados de esta familia y que ha demostrado buenos resultados en el control biológico es *H. bacteriophora*, el cual se ha utilizado contra larvas de la oruga de las leguminosas *Anticarsia gemmatilis* y el barrenador del brote *Crociosema aporema* con concentraciones de 50 y 500 JIs/larva de insecto, de igual manera es uno de los nematodos producidos comercialmente (Polack *et al.*, 2020).

2.3. Familia *Steinernematidae*

Los nematodos pertenecientes a esta familia, al igual que los *Herorhabditidos*, son parásitos obligados de insectos y se relacionan con la bacteria simbiótica *Xenorhabdus spp.* en el receptáculo intestinal (Cubillas y Flores, 2016). Los machos son más pequeños que las hembras y todas las especies presentan dimorfismo sexual, por esto los *Stenernemátidos* requieren que un juvenil infectivo hembra y uno macho invada al insecto hospedero y reproducirse (Cubillas y Flores, 2016; Fischer *et al.*, 1999).

El nematodo entomopatógeno *S. carpocapsae* presenta una simbiosis con la bacteria *X. nematophila*, cuando este nematodo se encuentra en el estadio de JI este se encuentra

colonizado por su bacteria simbiote en una región específica del intestino denominada vesícula (Figura 4) (Martens y Goodrich-Blair, 2005). La vesícula es una modificación de una porción del intestino de los nematodos de la familia *Steinernematidae*. En nematodos como *S. bibionis*, *S. kraussei*, *S. glaseri*, *S. feltidae* se observó que la ubicación de sus bacterias simbiotes se da específicamente en la vesícula (Bird y Akhurst, 1983).

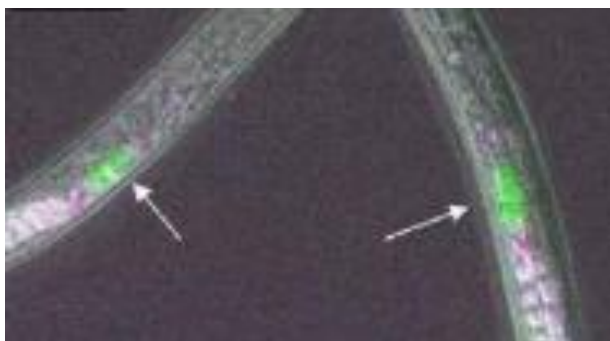


Figura 4. Bacteria *Xenorhabdus nematophila* colonizando la vesícula del nematodo *Steinernema carpocapsae* (Ciche *et al.*, 2006).

2.4. Nematodos nativos del Estado de Morelos

En los últimos años en el laboratorio de Control Biológico del Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) se han aislado e identificado varias especies de nematodos. En el 2014 se aislaron nematodos entomopatógenos en cultivos de caña de azúcar los cuales se identificaron como *Oscheius myriophila* (MC5) y *Caenorhabditis brenneri* (DS), MC5 fue aislado de muestras de suelo franco arenoso en Tepalcingo, Mor.; mientras que DS fue aislado directamente de una larva de *Diatraea magnifactella*. En el 2018 fue aislado otro nematodo entomopatógeno del suelo de caña de azúcar en Real del puente Xochitepec, Mor., identificado como *Heterorhabditoides sp* (XRPC4).

Se han realizado pruebas de patogenicidad y virulencia de estos nematodos, en donde DS tuvo una CL_{50} de 16 JI y MC5 tuvo una CL_{50} de 21 JI sobre larvas de *Diatraea magnifactella*, mientras que la cepa XRPC4 tuvo una CL_{50} de 12 JI sobre larvas de *Galleria mellonella* y 25 JI en larvas de *Tenebrio molitor* (Castro, 2014; Cruz, 2018; Castro, 2020).

La búsqueda de este tipo de organismos es de suma importancia, debido a que hoy en día muchas de las plagas ya son resistentes a varios de los insecticidas químicos que se encuentran en el mercado, por otro lado, se deben buscar alternativas más seguras y que no causen un gran impacto en el ambiente y otros organismos benéficos.

2.4.1. *Oscheius myriophila*

El nematodo entomopatógeno *O. myriophila* fue aislado de una muestra de suelo franco arenoso que posee un pH de 7.98 y un porcentaje de materia orgánica (M.O) de 2.02% en cultivos de caña de azúcar, en Tepalcingo, Mor. Su identificación se realizó mediante técnicas morfológicas y morfométricas, se observó una estoma tubular con un cuerpo faríngeo cilíndrico hinchado y metacorpus en la parte basal. Así mismo, también se realizó la identificación molecular utilizando la región ITS del ADN; al final se determinó que el nematodo es *O. myriophila* y se considera el primer reporte en México (Castro *et al.*, 2020).

En el 2020 Castro evaluó la patogenicidad del nematodo en larvas de *G. mellonella* y obtuvo una CL₅₀ de 4.732 JIs. Por otro lado Guadarrama en el 2015 evaluó la mortalidad y capacidad infectiva en larvas de *D. magnifactella* después de ser expuesta a diferentes agroquímicos utilizados regularmente en la industria agrícola; en este estudio *O. myriophila* en combinación con el insecticida Talstar produjo menor porcentaje de mortalidad, en cuanto a su capacidad infectiva se encontró que mantiene su capacidad después de ser expuesto a Talstar y Faena, produciendo un promedio de 2,163 y 598 NEPs respectivamente, esto es importante ya que el cultivo de caña de azúcar se aplica constantemente a insecticidas, herbicidas, fungicidas y fertilizantes.

El segundo estudio se realizó evaluando la producción *in vivo* de JI por larva de *G. mellonella* expuestas a concentraciones de 10, 30 y 50 JI, en donde se encontró que no hay diferencias significativas entre las concentraciones de inóculos iniciales, mientras que para la tasa de producción esta es menor a la concentración de 50 JI y mayor en la de 10 JI (Guadarrama y colaboradores, 2024).

2.5. Interacción Nematodo – Bacteria

Como se mencionó anteriormente los nematodos establecen relaciones simbióticas con bacterias presentes en su tracto intestinal, así, *Steinernematidae* se asocia principalmente con bacterias del género *Xenorhabdus* y *Heterorhabditidae* con bacterias del género *Photorhabdus*, aunque las bacterias pueden estar asociadas con más de una especie de nematodo (Goodrich y Clarke, 2007; Rodríguez, 2019; Cubillas y Flores, 2016).

Una vez que el JI encuentra un hospedero susceptible lo penetra normalmente por los orificios naturales, como son la boca, ano o espiráculos, llegan al hemocele y liberan sus bacterias, las cuales producen sustancias bioactivas que inhiben el sistema inmune y digieren los tejidos del hospedero; así mismo al reproducirse estas sirven como fuente de alimento para el crecimiento y desarrollo del nematodo. Por otro lado, se sabe que esas bacterias también producen antibióticos que evitan que otros microorganismos colonicen el cadáver, de forma que causan la muerte del hospedero por septicemia en 48 horas aproximadamente. Una vez que los NEPs se establecen dentro del hospedero estos comienzan a desarrollarse hasta el estado de adulto y se reproducen dentro del cadáver; cuando los nutrientes se terminan se forman nuevamente los JI, los cuales incorporan las bacterias y abandonan el cadáver buscando nuevos insectos hospederos (Figura 2) (Goodrich y Clarke, 2007; Kaya y Gaugler, 1993; Uribe *et al.*, 2005).

La relación entre el nematodo y la bacteria es de importancia, ya que el nematodo emplea a la bacteria como ayuda para superar las defensas humorales y celulares del hospedero, como sustrato para su crecimiento, reproducción y para proteger al cadáver del insecto contra microorganismos saprofitos; mientras que las bacterias a su vez lo utilizan como vector para entrar al hemocele del hospedero, así como para persistir fuera de este (Grewal *et al.*, 1997; Han y Ehlers, 1998).

Esta asociación mutualista también favorece el desarrollo, la multiplicación e infectividad de los NEPs, ya que aquellos que carecen de la bacteria suelen no causar la muerte o si la causan no crecen ni se reproducen (Grewal *et al.*, 1997; Han y Ehlers, 1998; Poinar *et al.*, 1977; Poinar y Thomas, 1966).

2.6. Bacterias Entomopatógenas

Las bacterias son organismos unicelulares que se localizan en diferentes hábitats como suelo, sedimento, animales, plantas e insectos, llegando a establecer comunidades en el interior de estos últimos. Por lo tanto, las bacterias entomopatógenas son capaces de evadir las defensas de un hospedero para proliferar y multiplicarse, causando enfermedad mediada por factores de patogenicidad como toxinas y enzimas (Jurat y Jackson, 2012). Algunos de los géneros más representativos son *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Serratia* y *Pseudomonas*; siendo *Bacillus thuringiensis* una de las especies más utilizadas como agente de control biológico (Grijalba *et al.*, 2018).

En el caso de los nematodos entomopatógenos los principales géneros de bacterias asociados a ellos son *Xenorhabdus*, *Photorhabdus* y *Serratia*. Se ha observado que la localización de estas bacterias dentro de los nematodos puede llegar a ser específica localizándose por ejemplo en una estructura llamada receptáculo (vesícula) la cual se localiza entre la unión del esófago y el intestino; por otro lado, también se sabe que algunas otras bacterias se pueden localizar en todo el lumen intestinal en los *Heterorhabditidos* (Dunphy y Thurston, 1990). En la Tabla 1, se mencionan algunas especies de bacterias asociadas al género *Steinernema* y *Heterorabdithis*.

Tabla 1. Bacterias asociadas a nematodos entomopatógenos (Modificada de Castro, 2014).

Género de nematodo	Especie de nematodo	Especie bacteriana
<i>Steinernema</i>	<i>S. abbasi</i>	Sin describir
<i>Steinernema</i>	<i>S. anatoliense</i>	Sin describir
<i>Steinernema</i>	<i>S. asiaticum</i>	Sin describir
<i>Steinernema</i>	<i>S. bicornutum</i>	Sin describir
<i>Steinernema</i>	<i>S. caudatum</i>	Sin describir
<i>Steinernema</i>	<i>S. ceratophorum</i>	Sin describir
<i>Steinernema</i>	<i>S. kari</i>	Sin describir
<i>Steinernema</i>	<i>S. carpocapsae</i>	<i>Xenorhabdus nematophila</i>
<i>Steinernema</i>	<i>S. cubanum</i>	<i>Xenorhabdus poinarii</i>
<i>Steinernema</i>	<i>S. glaseri</i>	<i>Xenorhabdus poinarii</i>
<i>Steinernema</i>	<i>S. feltiae</i>	<i>Xenorhabdus bovienii</i>
<i>Steinernema</i>	<i>S. affine</i>	<i>Xenorhabdus bovienii</i>
<i>Steinernema</i>	<i>S. intermedium</i>	<i>Xenorhabdus bovienii</i>
<i>Steinernema</i>	<i>S. kraussei</i>	<i>Xenorhabdus bovienii</i>
<i>Steinernema</i>	<i>S. kushidai</i>	<i>Xenorhabdus japónica</i>
<i>Steinernema</i>	<i>S. arenarium(anomali)</i>	<i>Xenorhabdus sp.</i>
<i>Steinernema</i>	<i>S. rarum</i>	<i>Xenorhabdus sp.</i>
<i>Steinernema</i>	<i>S. riobrave</i>	<i>Xenorhabdus sp.</i>
<i>Steinernema</i>	<i>S. ritteri</i>	<i>Xenorhabdus sp.</i>
<i>Steinernema</i>	<i>S. scapterisci</i>	<i>Xenorhabdus sp.</i>
<i>Steinernema</i>	<i>S. siamkayai</i>	<i>Xenorhabdus sp.</i>
<i>Steinernema</i>	<i>S. tami</i>	<i>Xenorhabdus sp.</i>
<i>Heterorhabditis</i>	<i>H. downesi</i>	<i>Photorhabdus sp.</i>
<i>Heterorhabditis</i>	<i>H. poinari</i>	<i>Photorhabdus sp.</i>
<i>Heterorhabditis</i>	<i>H. indica(hawaiiensis)</i>	<i>Photorhabdus luminescens</i>
<i>Heterorhabditis</i>	<i>H. marelata(hepiallius)</i>	<i>Photorhabdus luminescens</i>
<i>Heterorhabditis</i>	<i>H. bacteriophora</i>	<i>Photorhabdus luminescens</i>
<i>Heterorhabditis</i>	<i>H. meigidis</i>	<i>Photorhabdus temperata</i>
<i>Heterorhabditis</i>	<i>H. zealandica</i>	<i>Photorhabdus temperata</i>

2.7. Mecanismos de acción de las bacterias *Xenorhabdus sp.* y *Photorhabdus sp.*

La actividad insecticida de *Xenorhabdus sp.* y *Photorhabdus sp.* está asociada principalmente con la producción de proteínas y metabolitos secundarios que inhiben el sistema inmune de los insectos. Algunas de las toxinas que produce *Xenorhabdus sp.* son las Tcs (Complejos de toxinas) y Xlt (toxinas lipoproteicas), mientras que *Photorhabdus sp.* produce Pir (proteína relacionada con insectos), Mcf (actúan en los hemocitos), Pvc (casetes de virulencia) y Tcs (Wellington *et al.*, 2020).

Xenorhabdus reprime el sistema inmune al inhibir la síntesis de eicosanoides y la producción de fenoloxidasas, mientras que *Photorhabdus* actúa directamente en el epitelio intestinal de los insectos, provocando su destrucción y promoviendo la apoptosis de los hematocitos del hemocele, además puede producir toxinas que afectan directamente a la fosfolipasa A2 que tiene la función de catalizar ácidos grasos para la producción de prostaglandinas y leucotrienos indispensables en la ejecución de sistemas inmunes de los insectos (Figura 5) (Wellington *et al.*, 2020).

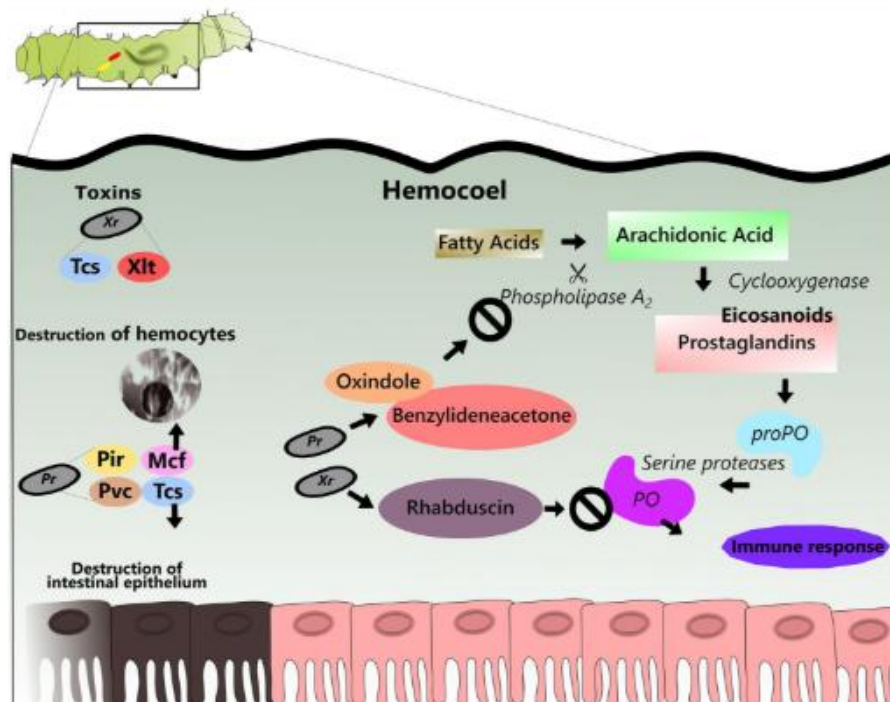


Figura 5. Mecanismo de acción de *Xenorhabdus sp.* y *Photorhabdus sp.* (Wellington *et al.*, 2020).

2.8. Bacterias aisladas de los nematodos nativos del Estado de Morelos

En el Laboratorio de Control Biológico del Centro de Investigación en Biotecnología (UAEM) se han obtenido diversos aislados bacterianos a partir de nematodos como *O. myriophila*, *C. brenneri* y *Heterorhabditoides* sp. En este contexto, la cepa MC5-R fue aislada de *O. myriophila*, mientras que las cepas DS-R y DS-B se aislaron de *C. brenneri*; adicionalmente, las cepas XRPC4-1 y XRPC4-2 se obtuvieron de un *Heterorhabditoides* sp. De acuerdo con su identificación molecular mediante el gen 16S, los aislados MC5-R y DS-R fueron asignados al género *Serratia*, en tanto que DS-B fue identificado como perteneciente al género *Bacillus* (Cruz, 2018). Actualmente, se continúa con la caracterización e identificación de los aislados XRPC4-1 y XRPC4-2.

Por otra parte, Cruz (2018) evaluó la patogenicidad y virulencia de estas bacterias empleando *Galleria mellonella* y *Tenebrio molitor* como organismos modelo. En *G. mellonella*, los aislados MC5-R y DS-R presentaron una DL50 inferior a 10 células por larva cuando fueron inoculados directamente en el hemocele. En contraste, para *T. molitor*, dichos aislados registraron valores de DL50 de 4.69×10^3 y 7.21×10^3 células por larva, respectivamente.

2.9. Género *Serratia*

Este género pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, está integrada por bacilos Gram negativos, cortos y rectos, generalmente móviles por flagelos (Von Gravenitz y Rubin, 1980). Pueden vivir en distintos ambientes con o sin oxígeno, es decir, son bacterias anaerobias facultativas. Este género se caracteriza por la producción de prodigiosina, pigmento rojo que es un compuesto derivado del pirrol (Steiner *et al.*, 1994); lectinasas, proteasas, toxinas extracelulares y quitinasas (Escobar *et al.*, 2001) las cuales son enzimas degradadoras que ayudan a la invasión al hemocele, multiplicándose rápidamente y produciendo la muerte del hospedero (Grijalba *et al.*, 2018).

Algunos miembros de este género pueden llegar a infectar un rango muy amplio de hospederos, incluyendo plantas, vertebrados e invertebrados (Grijalaba *et al.*, 2018). Por ejemplo, algunas especies que destacan dentro de este género son *S. marcescens*, *S.*

proteamaculans y *S. nematophila*, las cuales se han utilizado principalmente para el control de *Glossina spp.* (mosca tsetse), *Lucilia sericata* (mosca voladora), *Melolontha melolontha* (escarabajos de mayo) y *Helicoverpa zea* (gusano bolletero del maíz) (Grijalba *et al.*, 2018).

2.10. Localización de las bacterias en los Nematodos entomopatógenos

Distintos grupos de investigación se han dedicado a determinar cómo las bacterias se distribuyen dentro del tracto digestivo de los nematodos. En el 2012 Murfin y colaboradores evaluaron la visualización en microscopio de fluorescencia de la bacteria *X. nematophila* en el nematodo *S. carpocapsae* proporcionando información sobre la naturaleza de la asociación nematodo- bacteria y del proceso de colonización de la bacteria en el nematodo, para esto insertaron una proteína verde fluorescente (GFP) en *X. nematophila* con la cual alimentaron al nematodo *S. carpocapsae* en un medio *in vitro* de Lipid Agar y seleccionaron diferentes etapas del nematodos los cuales fueron colocados en portaobjetos y observados en un microscopio de fluorescencia; finalmente concluyeron que el método utilizado era eficiente para la detección óptica de bacterias dentro de la vesícula intestinal del nematodo (Murfin *et al.*, 2012.)

En el 2005 Martens y Goodrich-Blair investigaron la capacidad de colonización de la bacteria *X. nematophila* en el nematodo *S. carpocapsae* para esto analizaron la naturaleza y disponibilidad de nutrientes para *X. nematophila* marcada con la proteína verde GFP, concluyendo que los juveniles infectivos no colonizados por *X. nematophila* sobrevivían más que aquellos que eran colonizados, ya que al no alimentarse el juvenil infectivo aporta algunos de sus propios nutrientes al crecimiento de la bacteria simbiote dentro de la vesícula intestinal de *S. carpocapsae* (Martens y Goodrich-Blair., 2005).

En el 2011 Abebe y colaboradores estudiaron la asociación de la bacteria *Serratia sp.* con el nematodo *Caenorhabditis briggsae* mediante la inserción de una proteína roja fluorescente (RFP), además estudiaron la relación de estos en *G. mellonella*; concluyendo que *Serratia sp.* la cual se distribuye en todo su tracto intestinal es quien le confiere la patogenicidad a *C. briggsae* para matar a *G. mellonella* (Abebe *et al.*,2011).

En la Tabla 2 se muestran algunos ejemplos de bacterias que se han transformado con proteínas fluorescentes para poder localizar la bacteria dentro de su hospedero.

Tabla 2. Bacterias transformadas con proteínas fluorescentes.

Bacteria	Técnica	Nematodo	Herramienta	Referencia
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Coloración de Ziehl- Neelsen y tinción con auramina		Microscopio de fluorescencia y luz ultravioleta	Cafure <i>et al.</i> , 1974.
<i>Xenorhabdus nemaophila</i>	Proteína verde fluorescente (GFP)	<i>Steinernema carpocapsae</i>	Microscopio de fluorescencia	Martens y Goodrich-Blair., 2005.
<i>Xenorhabdus nemaophila</i>	Proteína verde fluorescente (GFP)	<i>Steinernema carpocapsae</i>	Microscopio de fluorescencia	Murfin <i>et al.</i> , 2012.
<i>Serratia sp.</i>	Proteína roja fluorescente (RFP)	<i>Caenorhabditis briggsae</i>	Microscopio de fluorescencia	Abebe <i>et al.</i> , 2011.
<i>Photorhabdus luminescens</i>	Proteína verde fluorescente (GFP)	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	Microscopio de fluorescencia	Ciche <i>et al.</i> , 2006

3. Justificación

El uso de nematodos entomopatógenos para el control de plagas ha tomado un auge muy importante, debido a que son efectivos para reducir las poblaciones de insectos en los cultivos y aunado a ello no causan efectos adversos al hombre y a otros organismos benéficos. Por otra parte, se sabe que los nematodos entomopatógenos establecen asociaciones simbióticas con bacterias, las cuales les permiten poder ser exitosos en los procesos de infección hacia su hospedero. Por ejemplo, las familias de nematodos entomopatógenos más estudiadas son *Steinernematidae* y *Heterorhabditidae* con aspectos enfocados principalmente en entender como causan la muerte de sus hospederos, y para ello es fundamental aislar y caracterizar a las bacterias asociadas a estos nematodos. Se sabe que algunas bacterias simbiotes como *Xenorhabdus* (asociadas a los nematodos de la familia *Steinernematidae*) suelen localizarse en un receptáculo localizado en la parte anteroposterior del intestino, caso contrario a lo que se observa con la bacteria *Photorhabdus*, la cual se distribuye en todo el tracto intestinal de los *Heterorhabditidos*. En este sentido, en Morelos se aislaron tres especies de nematodos identificados como *O. myriophila* (MC5-R), *C. brenneri* (DS) y *Heterorhabditoides sp.* (XRPC4), y se ha observado que muestran patogenicidad hacia larvas de *G. mellonella*, *Tenebrio molitor* y *D. magnifactella* las cuales son consideradas plagas de importancia agrícola. Por otra parte, se han logrado aislar sus bacterias simbiotes, sin embargo, aún se desconoce la especie y cuál podría ser su localización dentro del tracto intestinal del nematodo. Dado lo anterior, la importancia de este trabajo se enfoca en ampliar el conocimiento de este grupo de nematodos con potencial como agentes de control biológico, enfocándose principalmente en el nematodo *O. myriophila*, por lo cual, el proyecto pretende identificar la bacteria simbiote y ver la localización de esta bacteria dentro del tracto digestivo del nematodo mediante la inserción de un vector constitutivo que expresa una proteína verde fluorescente (GFP o mCherry).

4. Hipótesis

La bacteria MC5-R (*Serratia sp*) se localizará en todo el tracto intestinal del nematodo entomopatógeno *Oscheius myriophila*.

5. Objetivo General

Determinar la o las regiones del tracto intestinal en donde la bacteria MC5-R (*Serratia sp*) se aloja en el nematodo *Oscheius myriophila* e identificar su especie.

6. Objetivos específicos

1. Obtener bacterias MC5-R que tengan el vector pSVA que expresa una proteína fluorescente (GFP o mCherry) para poder detectarlas dentro del intestino de *O. myriophila* mediante fluorescencia.
2. Evaluar la estabilidad del vector pSVA dentro de la bacteria MC5-R.
3. Evaluar la patogenicidad de la bacteria MC5-R transformada con el vector pSVA en larvas de *Galleria mellonella*.
4. Obtener un cultivo axénico del nematodo *O. myriophila*, para evaluar que la patogenicidad del nematodo está asociada a la bacteria MC5-R.
5. Identificar la región del tracto intestinal en donde se aloja la bacteria MC5-R mediante microscopia de fluorescencia.
6. Identificar la cepa bacteriana MC5-R aislada del nematodo *O. myriophila* mediante la secuenciación del genoma.

7. Materiales y Métodos

7.1. Obtención del nematodo *Oscheius myriophila*

La cepa del nematodo *O. myriophila*, se obtuvo de la colección del Laboratorio de Control Biológico adscrito al Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB). Para reproducirlo se utilizó la técnica de insecto vivo y para cosecharlos las trampas White y se mantenidas a temperatura ambiente. A las 48h se recolectaron los nematodos de las trampas White y fueron almacenados en frascos Corning a 12°C. Para alimentar a los nematodos con la bacteria MC5-R nativa o MC5-R con el vector pSVA se utilizó el medio Lipid-agar (Murfin et al., 2012) que consta de Caldo nutritivo 8g/L, Extracto de levadura 5g/L, Cloruro de magnesio hexahidratado 10ml/L (0.2g/ml), Aceite de maíz 4ml/L, Jarabe de maíz 7ml/L (disuelto en 86ml de agua), Agar 15g/L y Agua destilada 890ml/L. Una vez gelificadas las cajas se sembró la cepa correspondiente y se incubó durante 24 h a 30°C, pasado este tiempo se colocaron en la caja 500 JI y se dejaron incubando por 72h, y cada 6-12 h se observaron en el microscopio estereoscópico para verificar que se estuvieran alimentando y reproduciendo adecuadamente.

7.2. Cepas bacterianas

La cepa MC5-R (*Serratia sp.*) se obtuvo de la colección del Laboratorio de Control Biológico del Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB). La cepa se reactivó para colonia única en cajas de LB (Lysogeny Broth) sin antibiótico y se incubó durante 12 h a 30°C. Al día siguiente se tomó una asada y se inocularon 2 ml de medio LB líquido, los tubos se incubaron 12 h a 30°C y después de este periodo se midió la absorbancia del cultivo a 620 nm.

Las cepas de *Escherichia coli* HD5α pSVA337R (mCherry) y *E. coli* HD5α pSVA337 (GFP), fueron proporcionadas por el laboratorio de Ingeniería Genómica del Centro de Ciencias Genómicas (CCG). Cada una de las cepas se reactivaron para colonia única en cajas

de LB con Cloranfenicol 30 µg/ml (Cm30) y se incubaron durante 24 h a 37°C. Al día siguiente para cada cepa se tomó una asada y se inocularon 2 ml de medio LB líquido Cm30, los tubos se incubaron 24 h a 37°C y después de este periodo se midió la absorbancia del cultivo a 620 nm.

La cepa *E. coli* PKR13, fue proporcionada por el laboratorio de Genómica Evolutiva del Centro de Ciencias Genómicas (CCG). La cepa se reactivó para colonia única en cajas de LB con Kanamicina 30µg/ml (Km30) y se incubó durante 24 h a 37°C. Al día siguiente se tomó una asada y se inocularon 2 ml de medio LB Km30 líquido, los tubos se incubaron 24 h a 37°C y después de este periodo se midió la absorbancia del cultivo a 620 nm.

7.3. Purificación del vector pSVA337R (mCherry) y pSVA337(GFP)

Las cepas de *E. coli* pSVA337R y pSVA337 se reactivaron en cajas de LB Cm30 sólido y se incubaron 12 h a 37°C. Al día siguiente se inocularon 10 ml de LB Cm30 líquido y se incubaron 12h a 37°C. Para llevar a cabo la purificación del vector se utilizó el kit Miniprep ZymoPure™ Plasmid (ZYMO RESEARCH) de acuerdo con las especificaciones del kit. El vector se eluyó en agua y se cuantificó mediante nanodrop utilizando el programa NANODROP 2000. La integridad del vector se verificó en un gel de agarosa al 1%.

7.4. Digestión del vector pSVA337R (mCherry) y pSVA337(GFP)

Para corroborar el tamaño de los vectores se realizó una digestión de ambos vectores, para pSVA 337R(mCherry) se utilizó la enzima XbaI y para pSVA 337(GFP) se utilizó SPEI. Se digirieron 800 ng de vector utilizando 1 U enzima (XbaI o SPEI) y el tubo se incubó durante 16 horas a 37°C, y después se corrió un gel de agarosa al 1%. La reacción se realizó de la siguiente manera: en un tubo eppendorf se colocaron 3.5µl del vector pSVA, 12.5µl de agua y 3µl de la enzima. En el gel de agarosa se corrieron el vector sin digerir, el vector digerido y un vector control de digestión (pJQ200), para correr el gel se utilizó una cámara de electroforesis con buffer TAE 1X y se corrió a 120 V durante 15 min. Para la visualización de las bandas del ADN se utilizó Bromuro de etidio durante 2 min, posteriormente se

realizaron dos lavados con agua destilada y el gel se observó en el G: Box transiluminador Gene Snap con el programa Image Acquisition software.

7.5. Obtención de la cepa MC5-R transformada con el vector pSVA(337/337R)

Para la obtención de la cepa MC5-R con el vector pSVA se emplearon dos metodologías, electroporación y conjugación, para la conjugación se utilizó la cepa *E. coli* PKR13 la cual es la encargada de formar el pili para que se dé la conjugación.

7.5.1. Método de Electroporación

La electroporación se realizó según el protocolo proporcionado por el Laboratorio de Ingeniería Genética (Anexo1), para este método primero se realizó la obtención de células electro-competentes de la cepa MC5-R la cual consistió en lavados de sacarosa al 0.3M (ver Anexo 1), luego se hicieron alícuotas de 50 μ l y se almacenaron a -80°C hasta su posterior uso. Para la electroporación se colocaron 800 ng del vector pSVA337R en 50 μ l de células electro-competentes y como control de transformación se utilizaron 50 μ l de agua en 50 μ l de células electro-competentes. Las células electro-competentes con el vector se colocaron en una celda para electroporar BIO-RAD verde (0.2cm) o café (0.1cm) y con ayuda de un electroporador se dio un pulso utilizando las siguientes condiciones: 1.8V con 200 Ω (celda café), 2.5V con 200 Ω (celda café) y 2.5V con 400 Ω (celda verde), posteriormente se procedió a recuperar las células electro-competentes en 1 mL de LB líquido sin antibiótico y se incubaron a 30°C durante 2h. Después de este tiempo se realizaron diluciones seriadas de 10^0 a 10^{-3} y se plaquearon en LB S/A y LB Cm30 y se incubaron a 37°C durante 12 h y al siguiente día se verificó el crecimiento de colonia única en las cajas del antibiótico correspondiente.

7.5.2. Conjugación

Para la conjugación primero se realizó un antibiograma de las cepas MC5-R, *E. coli* PSVA337R, *E. coli* PSVA337 y *E. coli* PKR13, esta prueba se realizó para determinar los antibióticos para la selección de las conjugantes, los antibióticos que se utilizaron fueron los siguientes: Cm30 µg/mL, Cm40 µg/mL, Amp100 µg/mL y Km30 µg/mL.

Una vez determinado los antibióticos a usar para la selección de las conjugantes, se procedió a realizar la mezcla de las cepas para favorecer el intercambio del plásmido. Primero se obtuvo un cultivo de cada una de las cepas en LB S/A líquido con una densidad óptica (DO) de 0.6. Después se procedió a realizar la conjugación (Anexo 2) utilizando una proporción de 2(MC5-R):1(*E. coli* PSVA337R/337):0.5(*E. coli* PKR13), esta mezcla se colocó en una caja de LB sin antibiótico y se incubó durante 12 h, posteriormente se recuperó el cultivo y se realizaron diluciones seriadas de 10^{-0} hasta 10^{-9} las cuales se platearon en cajas de LB con su respectivo antibiótico y se incubaron a 30°C por 12 h. Las clonas que se recuperaron se sembraron en cajas de LB Cm30 µg/mL /AMP100 µg/mL.

7.6. Estabilidad del vector pSVA dentro de la bacteria MC5-R

La estabilidad del vector se evaluó en las clonas obtenidas de las cepas MC5-R 337R (mCherry) y MC5-R 337 (GFP), con la finalidad de observar si las clonas perdían el vector al no estar sometidas a las condiciones de selección. Una vez obtenidas, las clonas se reactivaron en LB Cm40 µg/mL y posteriormente se realizaron cultivos en LB S/A a 30 °C durante 24 horas. Finalmente, se midió la absorbancia y se realizaron pases a cultivos en LB Cm40 µg/mL y LB S/A, los cuales se incubaron a 30 °C durante 24 horas. Después se midió nuevamente la absorbancia. Estos pases se realizaron durante más de 10 días, ya que se esperaba que los nematodos se alimentaran por más de 7 días. Además, la bacteria transformada podría perder el vector, dado que mantenerlo representa un gasto energético innecesario en ausencia del antibiótico de selección.

7.7. Obtención de un cultivo axénico del nematodo *Oscheius myriophila*.

Para obtener nematodos libres de bacterias nativas se llevó a cabo la obtención de un cultivo axénico del nematodo *O. myriophila* siguiendo el protocolo de producción de huevos axénicos (Anexo 2) de Murfin *et al.* (2012); el cultivo consistió en un co-cultivo de nematodos *O. myriophila* y la cepa MC5-R el cual fue incubado durante 3 días revisando la presencia de hembras grávidas y huevos cada 6 a 12 h, una vez observada la presencia de estos se procedió a recuperar los nematodos en un tubo eppendorf de 2 mL para después realizar lavados con agua estéril y retirar el exceso de esta. Posteriormente se realizó varios lavados con solución para lisis de huevos (hipoclorito de sodio al 10% e hidróxido de sodio al 0.2M) e incubar los tubos mientras se agitan suavemente durante exactamente 4 minutos y se centrifugaron a 1250 xg durante 10 min, después se realizaron lavados con soluciones reguladoras de fosfatos M1 y M2 de Suárez (2002), agua destilada estéril y antibióticos (Cloranfenicol 40 ug/mL, Ampicilina 300 ug/mL y Ketoconazol 30 ug/mL,). Los huevos obtenidos se incubaron en placas de Medio de huevo alcalino de 72 a 96 h, a temperatura ambiente en total oscuridad.

7.8. Localización de la cepa MC5-R en el nematodo *Oscheius myriophila*.

Para ver la localización de la cepa MC5-R en el tracto intestinal de *O. myriophila*, lo primero que se realizó fue alimentar a los nematodos con la bacteria transformada. La administración de la bacteria a los nematodos se realizó mediante la utilización de cajas Petri con medio Lipid agar (Anexo 4). La cepa MC5-R (337) y/o MC5-R(337R) se reactivaron en LB con Cm 30 µg/mL y posteriormente se estriaron en las cajas con medio Lipid agar. Después de 24 hrs, se colocaron los nematodos permitiendo que se alimentaran durante un periodo de 7 días. Posteriormente se tomaron varios nematodos y se inmovilizaron y/o fijaron

con formol salino al 4% y se almacenaron en oscuridad para poder observarlos en el microscopio de fluorescencia.

Para observar los nematodos en el microscopio óptico con campo de fluorescencia verde (488nm), primero se realizó la búsqueda y el enfoque en campo claro a 20X, una vez enfocado el nematodo este se observaba a 40X; finalmente se apagaba la luz blanca del microscopio, se cambiaba el filtro del pH0 a pH1 y se enciende la luz UV. Para localizar la fluorescencia de la bacteria en el nematodo se realizó un traslapado de las fotografías tomadas en campo claro y con el filtro de fluorescencia con la ayuda del programa ImageJ.

7.8.1 Inmovilización del nematodo *Oscheius myriophila*

La estrategia de inmovilización se utilizó con la finalidad de mantener vivo el nematodo y poder tener una distribución real de la bacteria dentro del tracto intestinal de *O. myriophila*. Para la inmovilización del nematodo *O. myriophila* se probaron 3 técnicas, estas consistieron en la utilización de frío, Levamisol al 0.075% y agarosa al 10%. Los nematodos, fueron sometidos a diferentes tiempos de exposición a la luz del microscopio óptico (5, 10, 15 y 20 minutos) para determinar el tiempo adecuado para poder hacer las observaciones en el microscopio de fluorescencia. La mortalidad y motilidad de los nematodos para cada una de las técnicas fue registrada por triplicado, con un total de 30 nematodos para cada técnica y como control positivo de sobrevivencia se utilizó agua. La sobrevivencia de los nematodos se cuantificó mediante la observación de los movimientos peristálticos en el tracto intestinal.

En el caso de la técnica de frío consistió en colocar en un portaobjetos una gota de agua, posteriormente se colocaron los nematodos y se cubrieron con un cubreobjetos. Los montajes se almacenaron a 12°C por 30 minutos, antes de observarlos al microscopio. Para la técnica de levamisol los nematodos se colocaron durante 1 minuto en una solución de levamisol al 0.075%, enseguida fueron colocados en una gota de agua dispuesta en un portaobjeto, finalmente se colocó encima el cubreobjetos; el sistema se mantuvo a temperatura ambiente y después de 30 minutos fueron visualizados en el microscopio.

La técnica de agarosa al 10% consistió en preparar una solución de agarosa al 10% y calentarla, posterior se colocó una gota en el centro del portaobjetos y con la ayuda de otro portaobjetos se presionó suavemente hasta formar una capa delgada de agarosa, finalmente se colocaron los nematodos y se cubrieron con cubreobjetos. Una vez montado el nematodo se procedió a almacenarlos a 12°C durante 30 minutos antes de visualizarlos en el microscopio. Al principio los montajes se realizaron con la ayuda del microscopio óptico, sin embargo, al observarlos en el microscopio de fluorescencia no se logró visualizar fluorescencia dado que la proteína al ser expuesta a luz continuamente se sobreexcitaba, por lo cual se procedió a realizar los montajes en la oscuridad y con la ayuda de una lupa.

Todos los portaobjetos se transportaron sobre hielo a 4°C en total oscuridad con la finalidad de mantenerlos inmovilizados por más tiempo y evitar la sobreexcitación de la proteína de fluorescencia para finalmente de esta manera poder hacer las visualizaciones en el microscopio de fluorescencia.

7.8.2 Fijación del nematodo *Oscheius myriophila*

La fijación de los nematodos se realizó con la finalidad de observar si la distribución de la bacteria en el tracto intestinal de *O. myriophila* era similar a la de los nematodos inmovilizados con agarosa. Para la fijación de los nematodos se utilizó formol salino al 4%, los nematodos se colocaron en una caja Petri con NaCl al 0.75% y posteriormente se les agregó el formol salino al 4% a punto de ebullición esto con la finalidad de extender completamente los nematodos, después se procedió a montarlos en un portaobjetos agregando glicerina:agua en una proporción de 1:20. Posteriormente se procedió a realizar el aclarado del tegumento, usando diferentes proporciones secuenciales de glicerina y agua: 1:20, 1:15, 1:10, 1:5 y 1:1. Después de agregar la primera proporción de glicerina : agua, este se colocó en una placa de calentamiento, este proceso puede durar hasta 8 horas por muestra aproximadamente.

7.9. Bioensayos de patogenicidad de la cepa MC5-R (337/337R)

Para evaluar que las cepas transformadas con el vector pSVA337 o 337R siguen siendo patógenas, se realizaron bioensayos en larvas de 5° estadio de *G. mellonella*. La inoculación de la bacteria se hizo por medio de una inyección directa en el hemocele con la ayuda de una jeringa de insulina de 30 unidades. Se utilizaron las cepas MC5-R nativa, MC5-R 337 y MC5-R 337R. Las larvas se desinfectaron superficialmente con alcohol al 70%, después se inocularon con 10 µl de la suspensión bacteriana a una dosis de 10⁵ células, finalmente se colocaron en cajas Petri con dieta hasta observar la larva muerta.

El porcentaje de mortalidad y el cambio de coloración de la cutícula se observó a las 24 y 48 horas, posteriormente los datos se analizaron mediante un ANOVA y para comparar si hay diferencias estadísticas entre los tratamientos se realizó una prueba Tukey, ambos análisis se realizaron con el programa R-comander.

7.10. Bioensayos de patogenicidad del nematodo axénico *Oscheius myriophila* y alimentado con su bacteria simbiote

Para evaluar la importancia de la bacteria simbiote en la patogenicidad de los nematodos entomopatógenos se realizaron bioensayos en larvas de 5° estadio de *G. mellonella*. Se utilizaron nematodos axénicos (nematodos libres de microorganismos) y axénicos alimentados durante 96 horas con las cepas, MC5-R, MC5-R 337, MC5-R 337R y *E. coli*. Las larvas se colocaron en cajas Petri de 60 x 15 mm y se infectaron con 21 JI, finalmente se sellaron con Parafilm.

El porcentaje de mortalidad se observó a las 48 y 72 horas, posteriormente los datos se analizaron mediante un ANOVA y para comparar si hay diferencias estadísticas entre los tratamientos se realizó una prueba Tukey, ambos análisis se realizaron con el programa R-comander Versión 4.3.3.

7.11. Secuenciación del genoma de la cepa MC5-R

Para la secuenciación del genoma de la cepa MC5-R se realizó la extracción de ADN de la cepa con el kit Bacterial Genomic DNA Isolation de BIOTEK y se mandó a secuenciar a la compañía Innomics Inc. La identificación de la especie se obtuvo mediante la colaboración del grupo de trabajo del Laboratorio de Genómica Evolutiva del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM.

7.12. Propagación del nematodo *Oscheius myriophila*

Para la propagación del nematodo *Oscheius myriophila* se evaluaron diferentes métodos, un método *in vivo* y dos métodos *in vitro* con la finalidad de comparar su eficiencia en términos de producción, viabilidad e infectividad del nematodo, así como determinar cuál de ellos resulta más adecuado para su uso en programas de control biológico.

7.12.1 Propagación del nematodo *Oscheius myriophila in vivo*

Para la propagación *in vivo* se utilizaron larvas de *Galleria mellonella* las cuales fueron pesadas para comprobar que su peso fuera similar. Una vez que se pesaron las larvas, se colocaron en una caja Petri de 60 x15 mm con un círculo de papel filtro, añadiendo una larva por caja e infectando con 100, 500 y 1000JI, estas se mantuvieron a temperatura ambiente durante 4 días y posteriormente se colocaron en trampas White.

Se utilizaron 5 larvas por tratamiento, con 3 repeticiones, y se realizaron conteos de NEPs cada 48 horas durante 15 días.

7.12.2 Propagación del nematodo *Oscheius myriophila in vitro*

Para la propagación *in vitro* se utilizaron dos medios de cultivo diferente, el primero fue el medio de huevo y el segundo el medio Lipid- Agar. Las cajas se inocularon con 100, 500 y 1000JI para cada respectivo medio tomando una caja de medio como una larva infectada

de la propagación *in vivo*, estas se mantuvieron a temperatura ambiente en total oscuridad y posteriormente se recolectaron los NEPs haciendo lavados con agua destilada estéril.

Se utilizaron 5 cajas de medio por tratamiento, con 3 repeticiones, y se realizaron conteos de NEPs después de 15 días.

8. Resultados

8.1. Digestión del vector pSVA337R (mCherry) y pSVA337(GFP)

Para corroborar que el vector con el que se trabajó correspondía a pSVA 337R y/o 337 se corrió un gel de agarosa con el vector pSVA 337R (Figura 6) digerido con la enzima XbaI (carril número 3) y sin digerir (carril número 2) y como control de digestión el vector pJQ200 (carril número 4). En el caso del vector pSVA 337 (Figura 7) no se realizó la digestión ya que no se contaba con la enzima SBEI por lo que solo se corroboró que la cepa creciera en Cloranfenicol 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y la observación de la cepa MC5-R transformada con el vector en el microscopio de fluorescencia. En base a los resultados obtenidos en la digestión del vector pSVA 337R se observó que el tamaño del vector corresponde a los tamaños esperados. En la Figura 6, se muestran los valores exactos correspondientes al tamaño del vector y de la proteína de fluorescencia mCherry, una vez que se corroboró que el vector corresponde a los tamaños esperados se procedió a realizar la transformación del vector en la cepa MC5-R.

8.2. Fluorescencia de la cepa MC5-R nativa

El pigmento de la prodigiosina de manera natural emite fluorescencia cuando se expone a una longitud de 532 nm, por eso era importante verificar si la cepa MC5-R tenía este comportamiento y lo que observamos fue que independientemente de la temperatura a la cual se creciera (30°C y/o 37°C) al exponerla en el espectrofotómetro de fluorescencia en el equipo Typhoon 9500, esta emite fluorescencia en el espectro de los rojos (Figura 8). Esto fue importante corroborar dado que la proteína que utilizaríamos para marcar a la bacteria sería una mCherry, sin embargo, se decidió obtener clonas transformadas con esta proteína para determinar si este pigmento puede interferir en la fluorescencia emitida por la mCherry, cabe resaltar, que esta fluorescencia se observó en cultivo bacteriano más no dentro del nematodo.

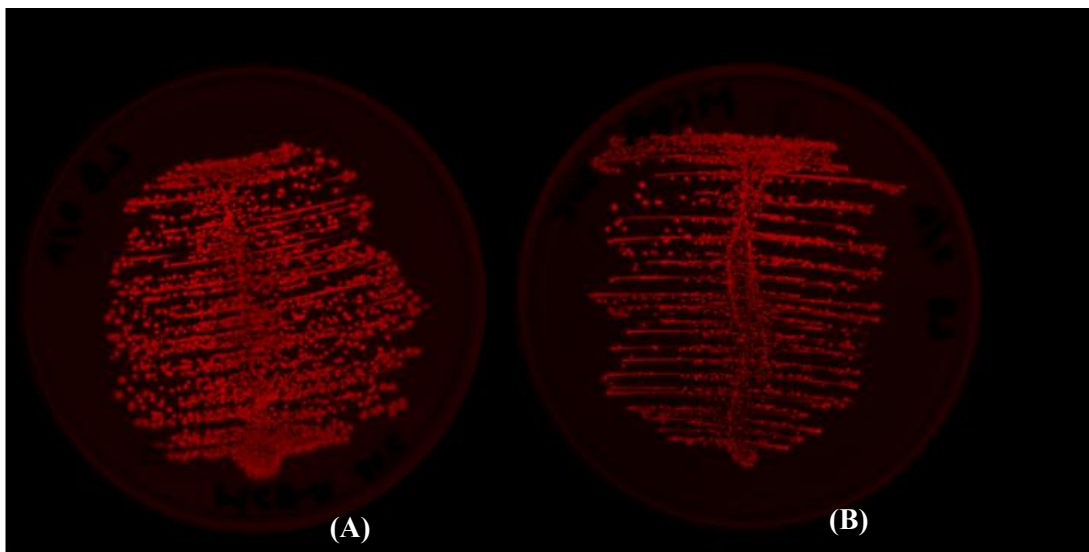


Figura 8. Prueba de fluorescencia de la cepa MC5-R en el microscopio de fluorescencia. (A) cultivo a 37°C (B) cultivo a 30°C.

8.3. Obtención de la cepa MC5-R con el vector pSVA(337/337R)

Con el objetivo de introducir los vectores pSVA337 y pSVA337R en la cepa *Serratia sp.* MC5-R, se implementaron dos estrategias de transformación: electroporación y conjugación.

8.3.1. Electroporación

En primer lugar, se intentó transformar la cepa MC5-R mediante el método de electroporación, utilizando diversas condiciones de voltaje y resistencia: 1.8V con 200 Ω , 2.5V con 200 Ω y 2.5V con 400 Ω . A pesar de observar crecimiento en las cajas de selección con antibiótico, ninguna de las clonas obtenidas emitió fluorescencia al ser analizadas mediante espectrofotometría de fluorescencia. Esto indica que las colonias crecientes no incorporaron exitosamente el plásmido de interés o que la expresión del gen marcador no fue adecuada. Por lo tanto, se concluyó que la electroporación no fue efectiva para la transformación de esta cepa bajo las condiciones probadas.

8.3.2. Selección de clonas conjugantes: importancia del antibiograma

Previo a la selección de las clonas conjugantes, se realizó un antibiograma (Figura 9) para determinar el perfil de resistencia de la cepa MC5-R. Este análisis reveló que la cepa presenta resistencia natural a ampicilina (AM), un hallazgo de gran relevancia ya que no se conocía previamente en el laboratorio y resultó fundamental para establecer la estrategia de selección de clonas conjugantes.

Por otro lado, se comprobó que MC5-R no presenta resistencia natural a cloranfenicol (Cm) a una concentración de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, lo cual también fue determinante. Si la cepa hubiese sido naturalmente resistente a Cm, habría sido complicado seleccionar aquellas clonas que hubiesen incorporado los vectores pSVA337 y/o pSVA337R, independientemente del método de introducción del plásmido.

Con base en los resultados del antibiograma, se estableció un medio de selección que combinara ambos antibióticos, utilizando placas de agar LB suplementadas con cloranfenicol (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Figura 10). Esta mezcla permitió una selección eficiente de las clonas conjugantes.

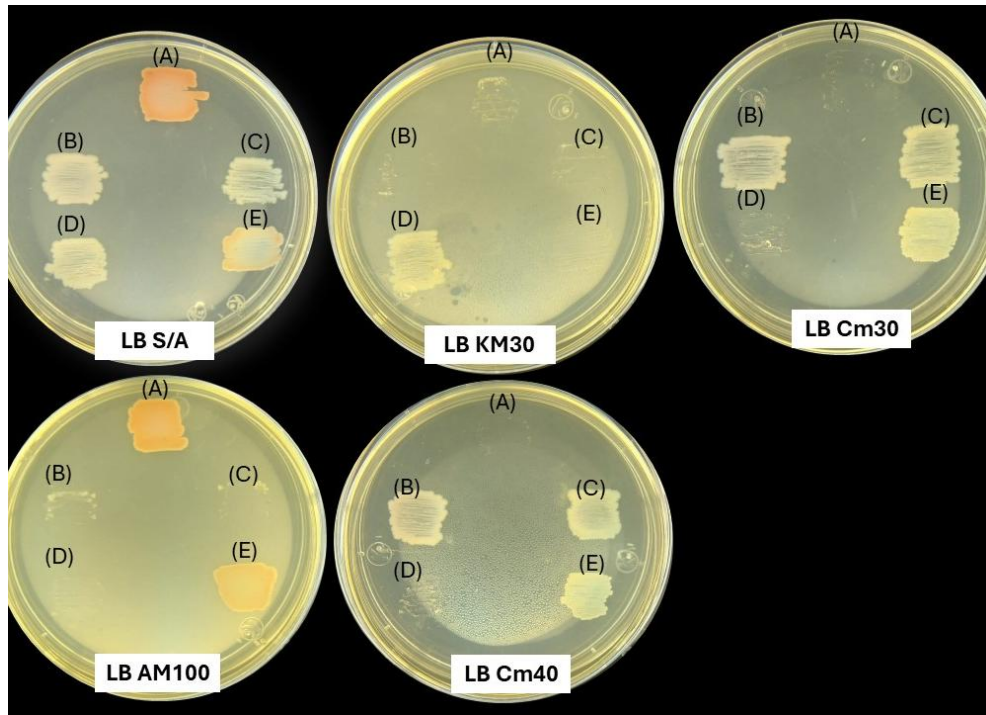
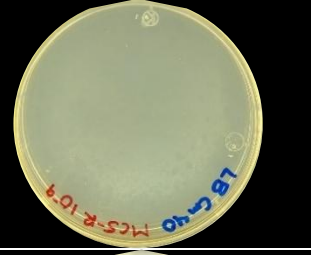



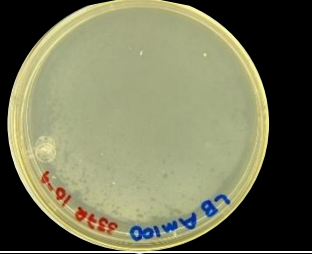

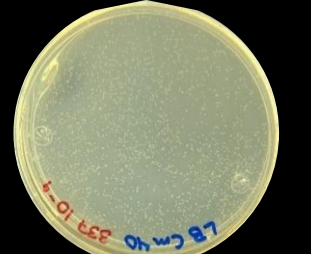
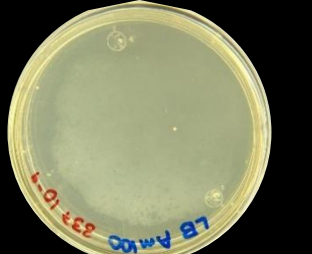

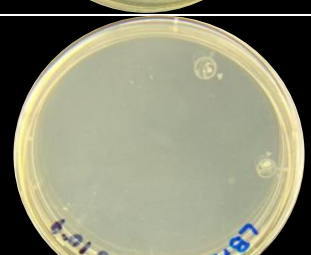
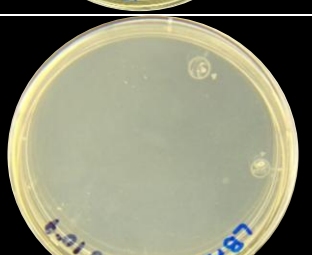
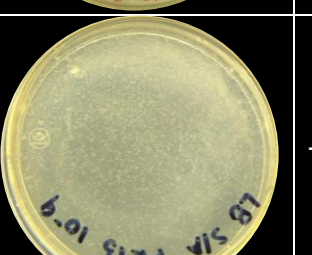




Figura 9. Antibiograma. Las letras en las cajas indican la cepa que se sembró en los distintos antibióticos. (A)MC5-R, (B)*E. coli* PSVA 337R(mCherry), (C) *E. coli* PSVA 337(GFP), (D) *E. coli* PKR13 y (E) Clona de la electroporación (posible contaminante).

8.3.3. Conjugación

Posteriormente, se llevó a cabo la transformación mediante conjugación, técnica con la cual sí fue posible obtener clonas transformadas exitosamente con ambos vectores (Figura 10). Para el caso del vector que porta el gen mCherry, se aislaron 18 clonas, mientras que para el vector con el gen GFP, se obtuvieron 36 clonas. Este resultado demuestra que, en comparación con la electroporación, la conjugación es un método más eficiente para introducir material genético en *Serratia* sp. MC5-R. Un aspecto adicional que facilitó la identificación de las clonas transformadas fue la conservación de la pigmentación roja característica de la cepa MC5-R. Esta característica fenotípica se mantuvo en las clonas que crecieron tras el proceso de conjugación, lo cual, junto con la selección por antibióticos y la expresión de los genes fluorescentes, permitió una identificación confiable de las clonas exitosamente transformadas (Figura 11).

Figura 10. Resultados de la conjugación en diferentes medios.

	LB Cm40	LB Am100	LB S/A	LB Cm40+Am100
MC5-R				-----
<i>E. coli</i> PSVA 337R				-----
<i>E. coli</i> PSVA 337				-----
<i>E. coli</i> PKR13				-----
MC5-R PSVA 337R (mCherry)	-----	-----	-----	
MC5-R PSVA 337 (GFP)	-----	-----	-----	

Posterior a la selección de las clonas para ambos vectores estas clonas se crecieron en LB sólido y fueron observadas en el espectrofotómetro de fluorescencia Typhoon 9500, en el cual se comprobó que las 36 clonas de MC5-R 337(GFP) mostraron fluorescencia en la emisión de longitud de onda verde (Figura 12), mientras que de la MC5-R 337R (mCherry) solo 15 mostraron fluorescencia en la longitud de onda roja (Figura 13).

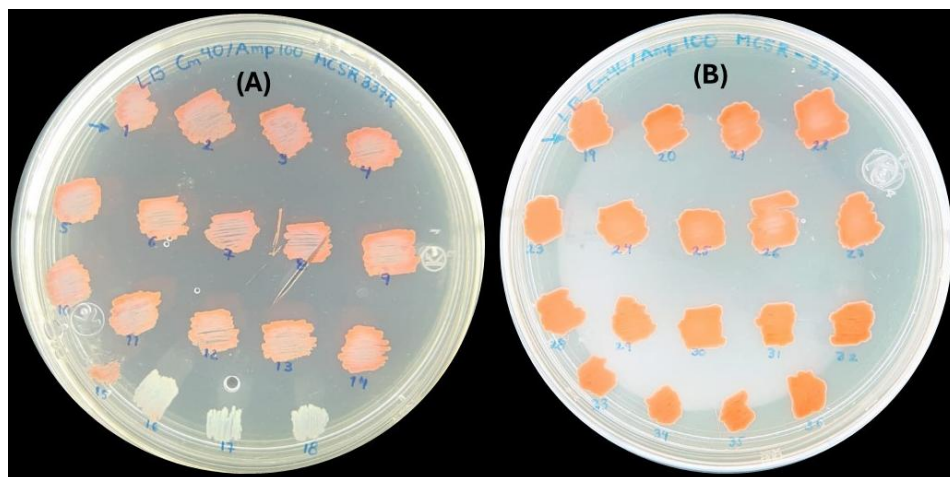


Figura 11. Clonas de la conjugación en medio LB Cm40 + Am100. (A) MC5-R 337R (mCherry) y (B) MC5-R 337 (GFP), sin ser expuestas al espectrofotómetro de fluorescencia.

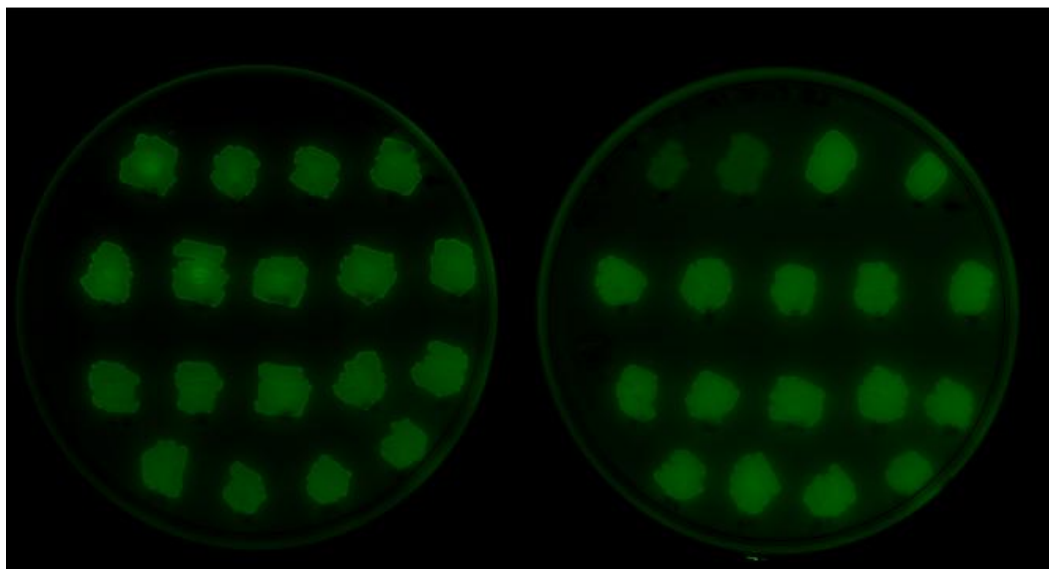


Figura 12. Clonas MC5-R 337 (GFP) que mostraron fluorescencia al ser observadas en el espectrofotómetro de fluorescencia (Typhoon 9500) a 488nm.

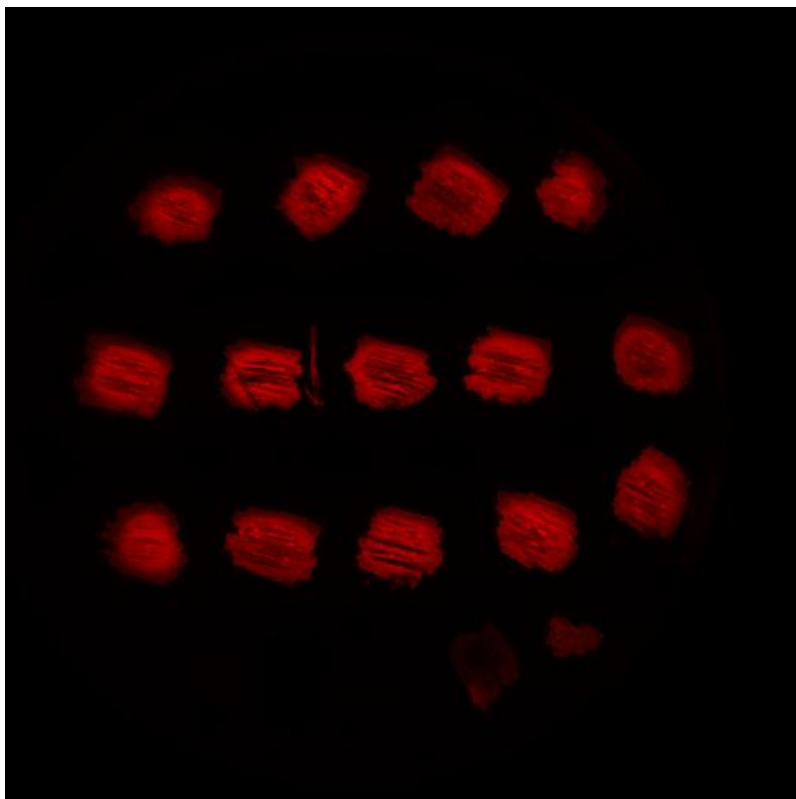


Figura 13. Clonas MC5-R 337R (mCherry) que mostraron fluorescencia al ser observadas en el espectrofotómetro de fluorescencia (Typhoon 9500) a 532nm. Las últimas tres cepas ubicadas en la parte inferior de la imagen no dieron fluorescencia.

Con base a los resultados obtenidos anteriormente, se seleccionaron las clonas que mostraron mayor intensidad de fluorescencia tanto para la MC5-R con el vector pSVA337R como con el vector pSVA337. Las clonas seleccionadas se sembraron en LB sin antibiótico y en esa misma caja se sembró la cepa MC5-R nativa para comparar la fluorescencia entre ellas y evaluar la intensidad que presentaba la MC5-R con el vector pSVA337R(mCherry) y la cepa nativa de MC5-R. Los resultados muestran que las cepas MC5-R con el vector presentaban mayor emisión de fluorescencia que la cepa nativa a una longitud de onda de 532nm (Figura 14). Lo anterior nos indica, que a pesar de que la cepa nativa da fluorescencia de manera natural el introducir un vector en el espectro de los rojos también podría funcionar para poder seguir a la bacteria dentro del nemato, dado que la emisión de fluorescencia es mucho mayor. Por otra parte, la cepa MC5-R nativa no emitió fluorescencia en el espectro del verde (Figura 15), comparado con las clonas

que tienen el vector pSVA337 las cuales si emitieron una fluorescencia verde (Figura 10).

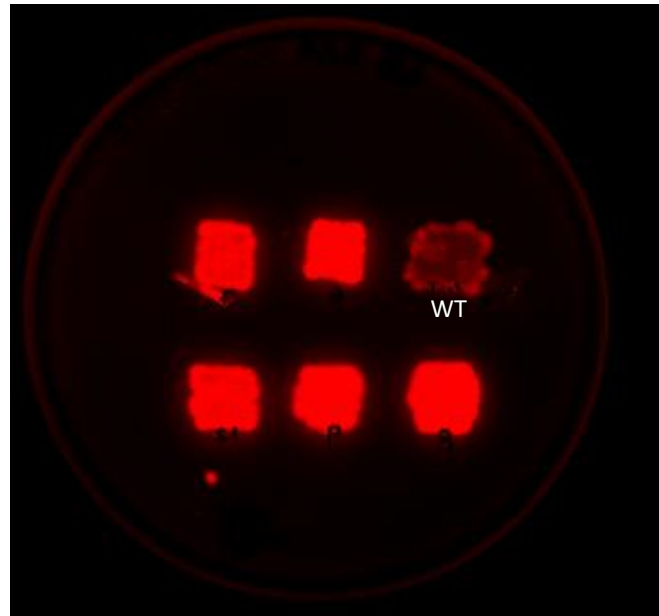


Figura 14. Clonas de la cepa MC5-R que tienen el vector pSVA337R (mCherry) comparadas con la cepa MC5-R nativa a una longitud de onda de 532nm. Imagen obtenida en el espectrofotómetro de fluorescencia (Typhoon 9500).

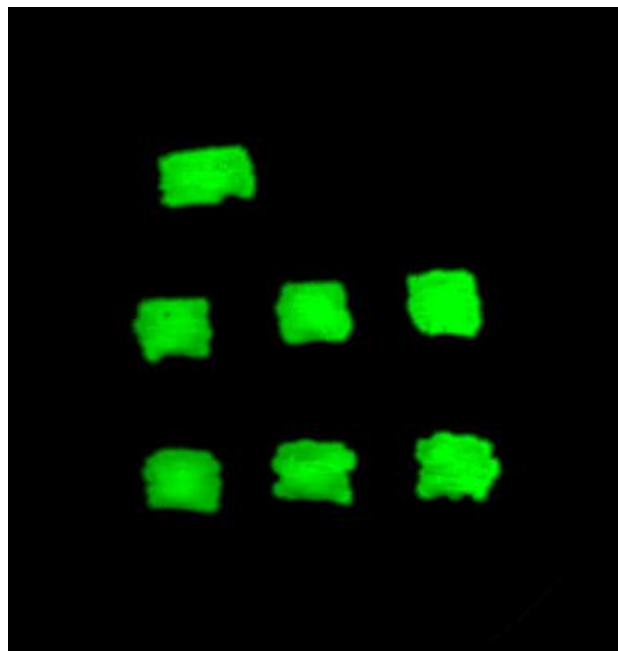
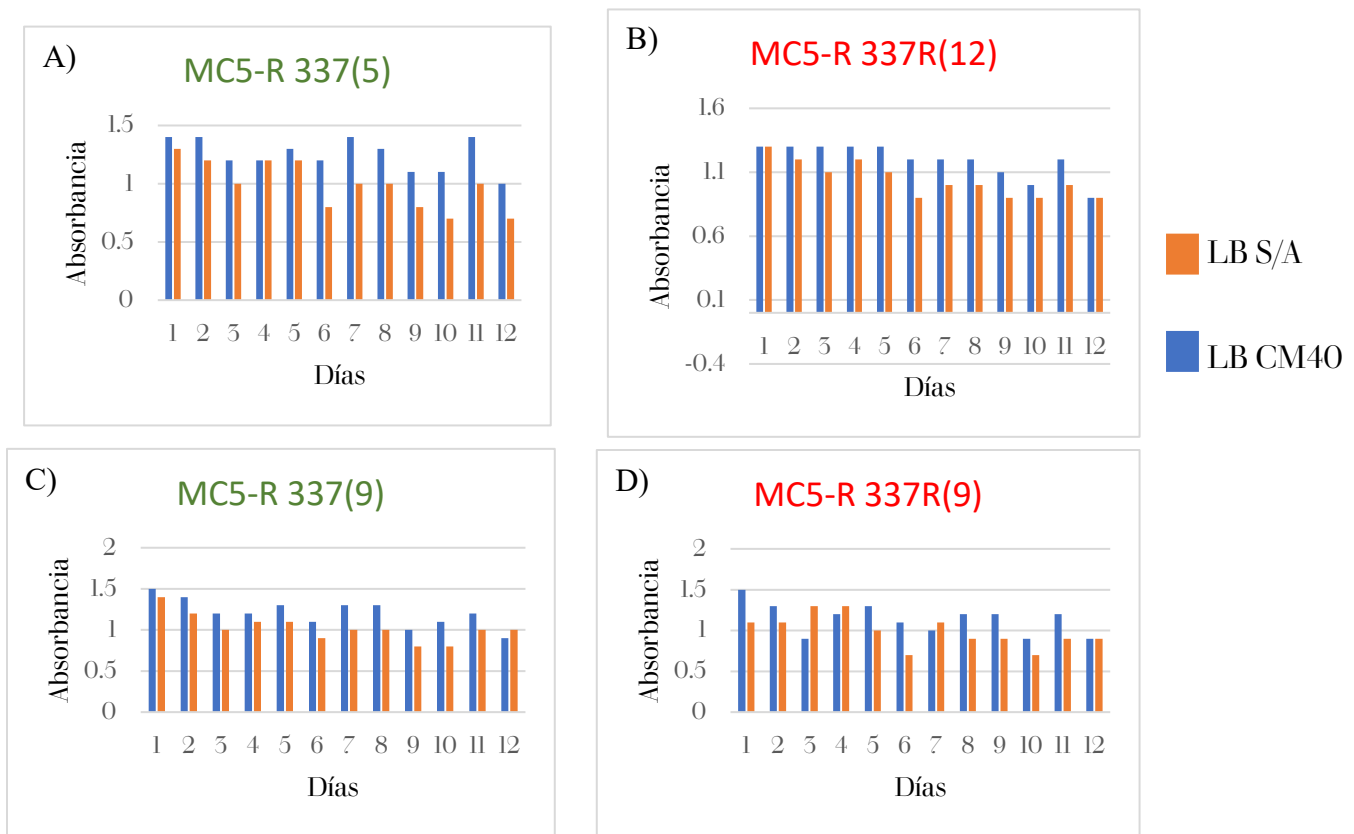


Figura 15. Clonas de la cepa MC5-R que tienen el vector pSVA337 (GFP) comparadas con la cepa MC5-R nativa a una longitud de onda de 488nm. Imagen obtenida en el espectrofotómetro de fluorescencia (Typhoon 9500).

8.3 Estabilidad del vector pSVA dentro de la bacteria MC5-R

La estabilidad del vector se evaluó únicamente en dos clonas de las cepas MC5-R 337R (mCherry) y MC5-R 337 (GFP), debido a la disponibilidad del material. Como se muestra en la Gráfica 1, el vector pSVA (GFP/mCherry) se mantiene estable por más de 10 días, lo cual es favorable para el establecimiento de la alimentación del nematodo *Oscheius myriophila* en el co-cultivo sobre Lipid Agar, ya que se esperaba que los nematodos se alimentaran durante un periodo superior a 7 días.

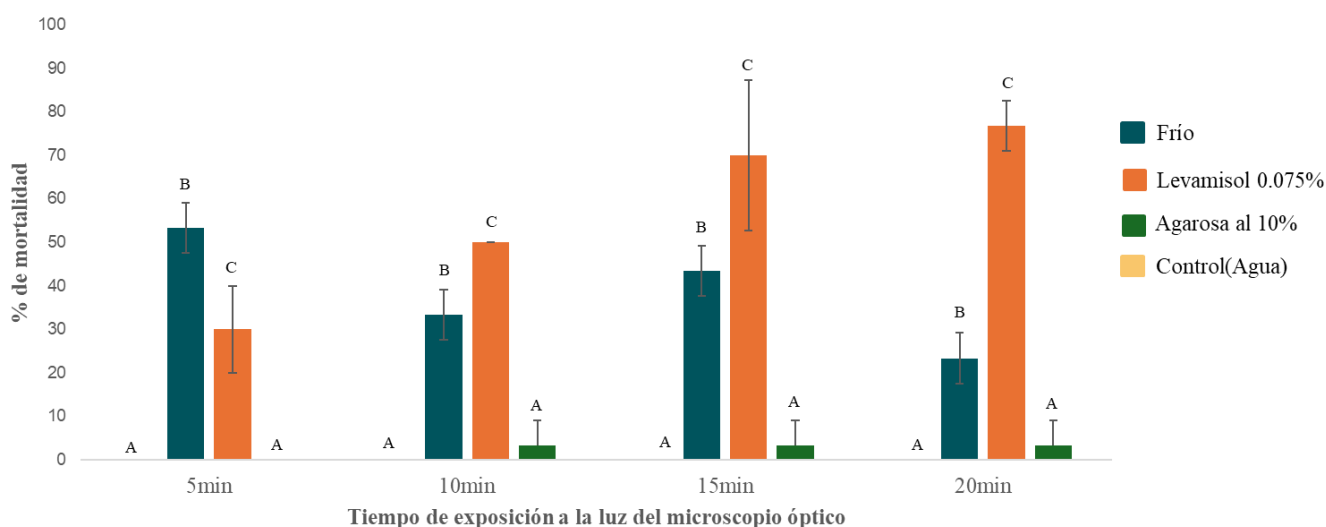


Gráfica 1. Estabilidad de las clonas de la cepa MC5-R con el vector pSVA. A) Clona MC5-R 337 (5), B) Clona MC5-R 337 (9), C) Clona MC5-R 337 (9) y D) Clona MC5-R337 (12).

8.4 Inmovilización del nematodo *Oscheius myriophila*

Para la inmovilización de los nematodos vivos se evaluaron tres técnicas diferentes: frío, levamisol al 0.075% y agarosa al 10%. Con base a los resultados obtenidos en los distintos tiempos de exposición a la luz del microscopio óptico (5, 10, 15 y 20 minutos). En la Gráfica 2, se puede observar que las técnicas con mayor mortalidad de nematodos fue la de levamisol al 0.075% con mortalidades del 30% al 76.66%, y la de frío con mortalidades del 23.33% al 53.33%. En comparación con la técnica de Agarosa, en donde los porcentajes de mortalidad fueron menores del 10%. También se puede observar que conforme aumenta la exposición de luz en la técnica de levamisol la mortalidad se incrementa significativamente, lo anterior quizás indica que el levamisol es tóxico para el nematodo. En contraste con la técnica en frío, en donde se puede observar que la mortalidad es variable a los distintos tiempos, quizás esto se deba propiamente a las características individuales de cada nematodo para adaptarse a cambios drásticos de temperatura. Sin embargo, en la agarosa el tiempo de exposición no afecta la sobrevivencia del nematodo, lo anterior quizás se deba a que la agarosa le proporciona condiciones de humedad que le permiten al nematodo tolerar la exposición al calor emitido por la luz del microscopio. Lo que sí se pudo observar, es que después de 20 minutos de estar expuestos a la luz del microscopio, estos comenzaban a moverse libremente por todo el portaobjetos, lo anterior podría deberse a que, tras este tiempo, la agarosa alcanza una temperatura cálida que reactiva su movilidad. Dado los resultados anteriores, la técnica que fue seleccionada para hacer las observaciones en el microscopio de fluorescencia fue la de agarosa al 10%, misma que también nos permitió

tener inmovilizado al nematodo por casi 20 minutos, tiempo suficiente para poder hacer las observaciones pertinentes al microscopio.



Grafica 2. Porcentaje de mortalidad de los nematodos con diferentes técnicas de inmovilización a la exposición de la luz del microscopio óptico a distintos tiempos. Las líneas en las barras indican la \pm Desviación Estándar. ANOVA y prueba de Tukey *Letras iguales no presentan diferencias significativas ($P < 0.05$).

8.5 Localización de la cepa MC5-R en el nematodo *Oscheius myriophila*

Para la observación de la bacteria con la cepa MC5-R337R(mCherry) y/o la MC5-R337(GFP) se alimentaron los nematodos en medio Lipid agar con la bacteria correspondiente durante 7 días a temperatura ambiente y en completa oscuridad para evitar la pérdida de fluorescencia. Posteriormente se tomó un grupo de nematodos y se inmovilizaron en agarosa al 10% y se almacenaron a 12°C antes de observarlos al microscopio. También se procedió a realizar un montaje de nematodos fijados en formol salino al 4%, para determinar si la fluorescencia es similar estando vivos o muertos.

Al realizar las observaciones en el microscopio compuesto a un objetivo de 40X los nematodos alimentados con la cepa MC5-R337R (mCherry), se observó que el tracto intestinal del nematodo presentaba una coloración roja en comparación con aquellos nematodos que se alimentaron con la cepa silvestre de MC5-R (Figura 16) En base a las

observaciones se puede observar que la bacteria se distribuye por todo el tracto intestinal del nematodo *O. myriophila*.



Figura 16. Nematodos alimentados con la cepa MC5-R337R (mCherry) y silvestre MC5-R. A) Nematodo alimentado con la cepa silvestre MC5-R. B) Nematodo alimentado con la cepa MC5-R337R (mCherry). Las observaciones se realizaron con un objetivo 40x.

La observación de los nematodos alimentados con la cepa MC5-R337(GFP), se realizó en un microscopio óptico con campo de fluorescencia verde (488nm) usando los objetivos 20X y 40X. En base a los resultados obtenidos, se pudo observar que la cepa se distribuye por todo el tracto intestinal del nematodo *O. myriophila*. La fluorescencia de la bacteria con la GFP se pudo observar tanto en los nematodos inmovilizados (vivos) con agarosa al 10% (Figura 17);, como en los fijados con formol salino (muertos) (Figura 18).

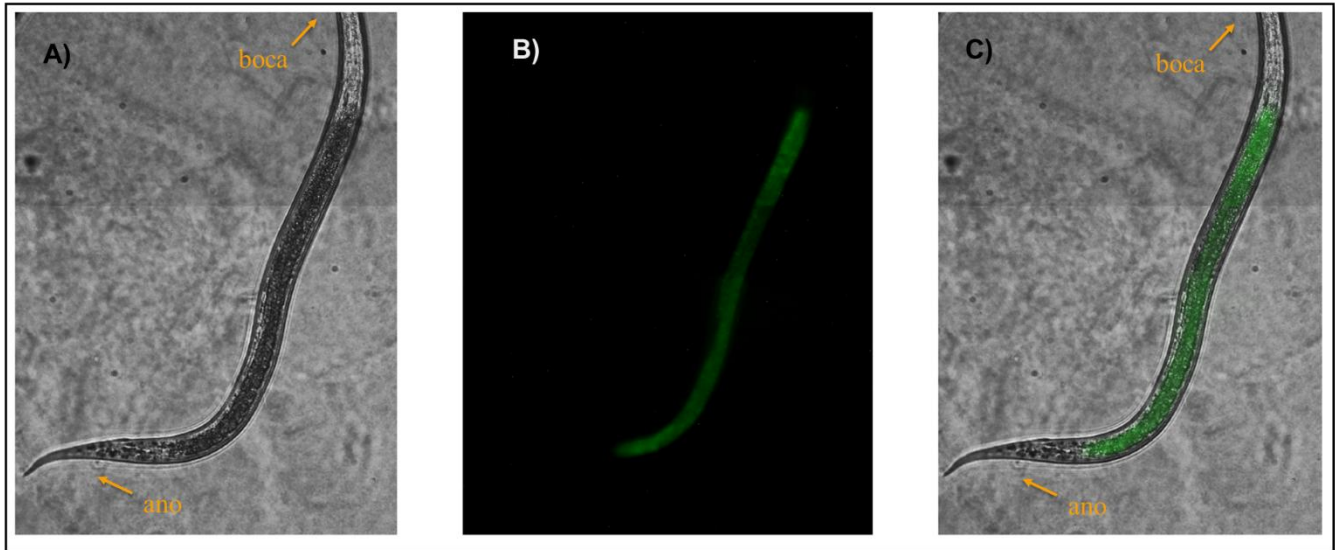


Figura 17. El nematodo *O. myriophila* alimentado con la cepa MC5-R 337 e inmobilizado en Agarosa al 10% en el microscopio de fluorescencia a 40X. A) Nematodo en campo claro B) Nematodo en el campo de fluorescencia a 488nm C) Nematodo traslapado con el programa ImageJ para localización de la fluorescencia.

En los nematodos fijados con formol salino (Figura 18) se puede observar que la distribución de la cepa MC5-R 337(GFP) es en todo el tracto intestinal, sin embargo, la fluorescencia de esta se encuentra fragmentada esto puede deberse al movimiento peristáltico cuando se estaba fijando o a que apenas se encontraba alimentando y no había suficiente alimento. Por otro lado, en los nematodos alimentados con la cepa MC5-R nativa (Figura 19) a una longitud de onda de 488nm se puede observar una ligera fluorescencia del tegumento la cual desaparece al regularse los niveles de exposición, esto se debe a la presencia de ciertos compuestos naturales en el tegumento que tienden a emitir fluorescencia al ser excitados con determinadas longitudes de onda de luz como es el colágeno. Si bien es posible utilizar la cepa marcada con la proteína GFP para su detección en el tracto intestinal del nematodo, es fundamental ajustar cuidadosamente los parámetros de exposición durante la observación de la fluorescencia, a fin de evitar falsos positivos ocasionados por la autofluorescencia del tegumento.

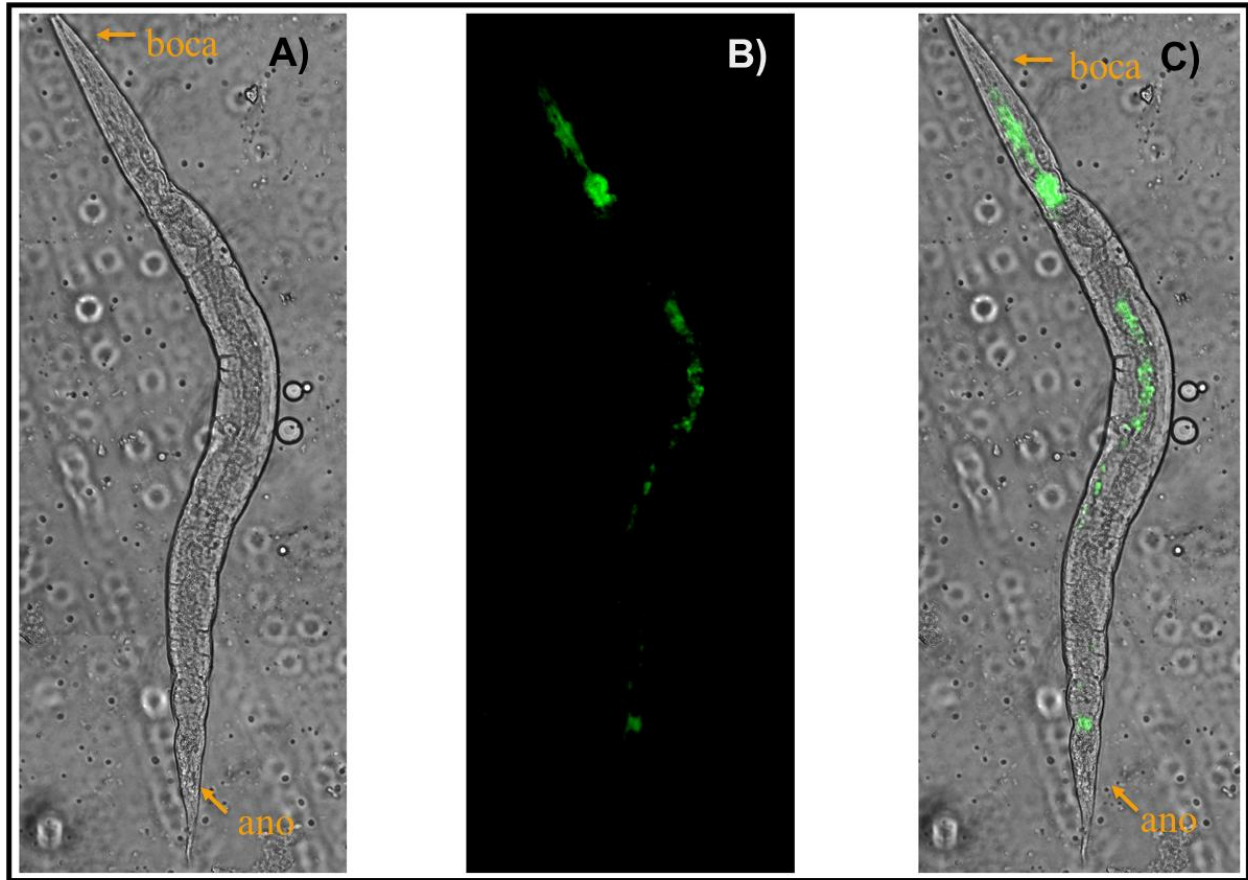


Figura 18. Nematodo *O. myriophila* alimentado con la cepa MC5-R 337 y fijado con formol salino al 4% en el microscopio de fluorescencia a 40X. A) Nematodo en campo claro B) Nematodo en el campo de fluorescencia a 488nm C) Nematodo traslapado con el programa ImageJ para localización de la fluorescencia.

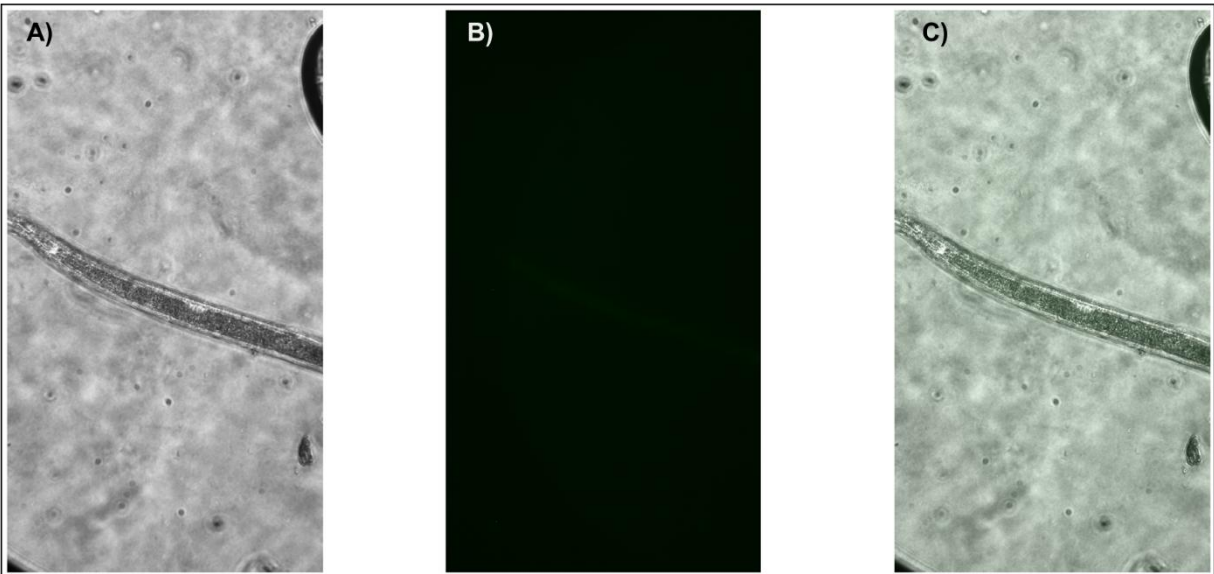


Figura 19. El nematodo *O. myriophila* alimentado con la cepa MC5-R nativa e inmovilizado en Agarosa al 10% en el microscopio de fluorescencia a 40X. A) nematodo en campo claro B) fluorescencia natural del nematodo C) Nematodo traslapado con el programa ImageJ para localización de la fluorescencia.

Posteriormente se realizó la observación de los nematodos alimentados con la cepa MC5-R 337(GFP) y MC5-R 337R(mCherry), mediante la utilización de un microscopio de fluorescencia AXIO con campo verde (488 nm) y campo rojo (532 nm) el cual amplifica la fluorescencia hasta 37 veces, usando los objetivos 20X y 40X. En base a los resultados obtenidos se puede observar que las cepas se distribuyen por todo el tracto intestinal del nematodo *O. myriophila*, en esta segunda observación la bacteria con la GFP (Figura 20) muestra fluorescencia desde la faringe, esto puede deberse a que la inmovilización del nematodo se realizó mientras se encontraba alimentándose. Por otra parte, el nematodo alimentado con la cepa MC5-R nativa no muestra fluorescencia a 488 nm. En el caso de la bacteria mCherry se puede observar la distribución de la cepa por todo el tracto intestinal, sin embargo, en la Figura 22 se observa que a diferencia del nematodo de la Figura 20 la fluorescencia empieza en la parte final de la faringe, esto puede deberse a que la inmovilización del nematodo se realizó poco tiempo después de alimentarse. Finalmente se observó que el nematodo alimentado con la bacteria nativa tampoco presentó fluorescencia a 532 nm (Figura 23). Con base en lo observado y considerando las limitaciones previamente mencionadas en el uso de la cepa marcada con la proteína GFP, se concluye que la cepa

marcada con la proteína mCherry resulta más eficiente para la detección de la cepa MC5-R en el tracto intestinal del nematodo *Oscheius myriophila*.

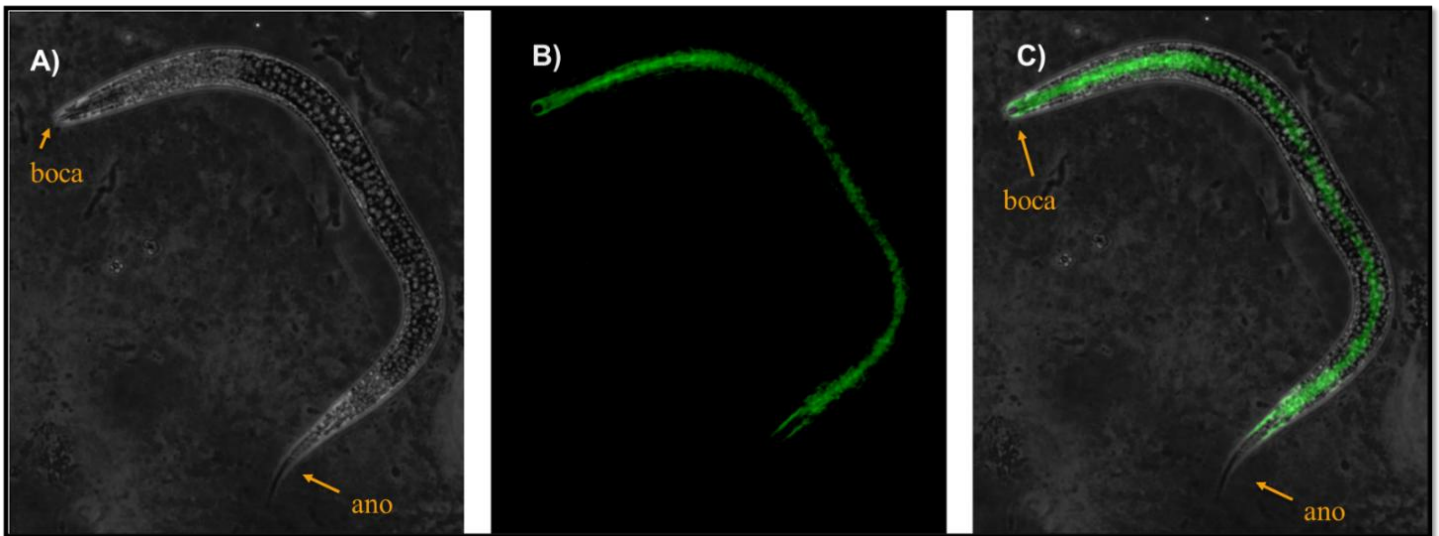


Figura 20. El nematodo *O. myriophila* alimentado con la cepa MC5-R 337 e inmobilizado en Agarosa al 10% en el microscopio de fluorescencia a 40X. A) Nematodo en campo claro B) Nematodo en el campo de fluorescencia a 488nm C) Nematodo traslapado con el programa ImageJ para localización de la fluorescencia.

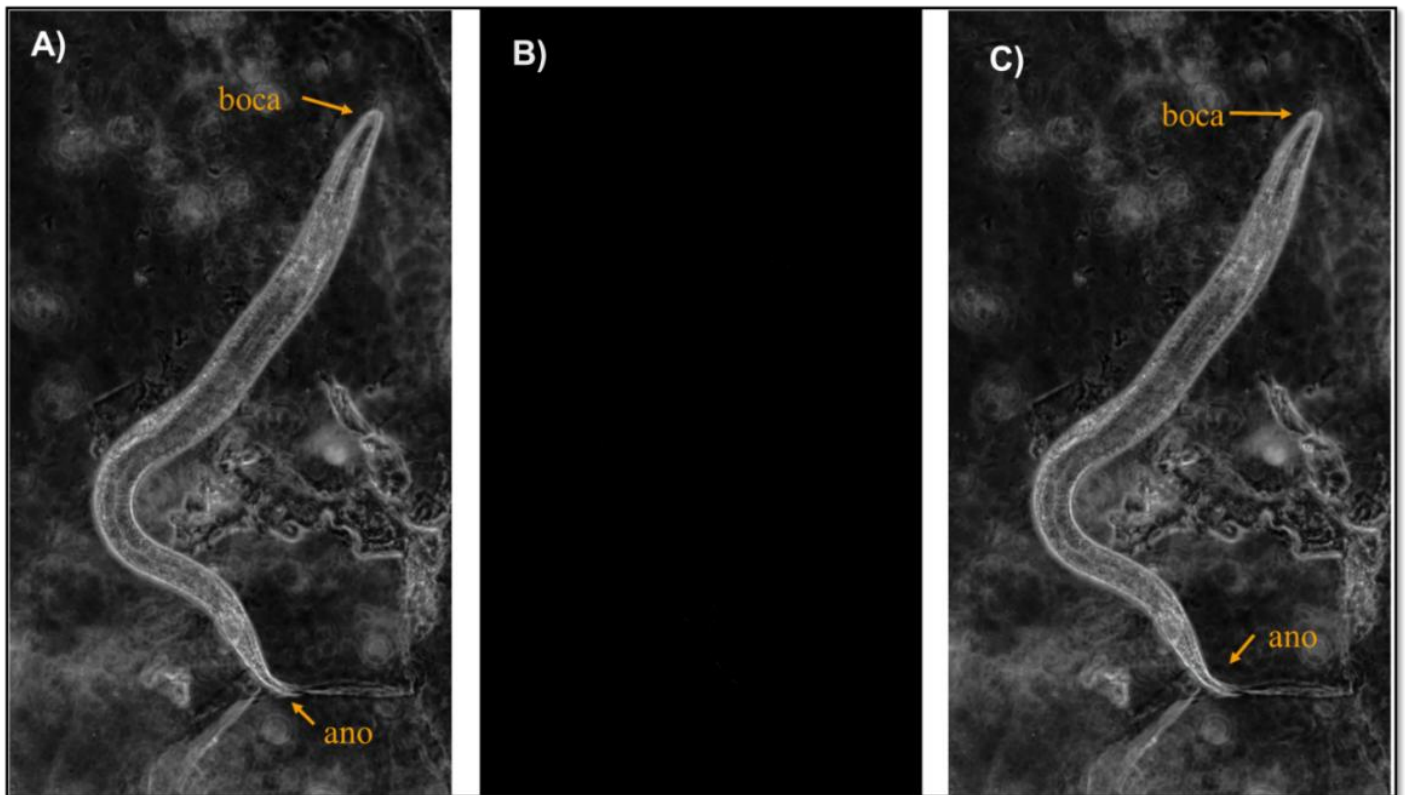


Figura 21. El nematodo *O. myriophila* alimentado con la cepa MC5-R nativa e inmovilizado en Agarosa al 10% en el microscopio de fluorescencia a 40X. A) nematodo en campo claro B) Nematodo en el campo de fluorescencia a 488nm C) Nematodo traslapado con el programa ImageJ para localización de la fluorescencia.

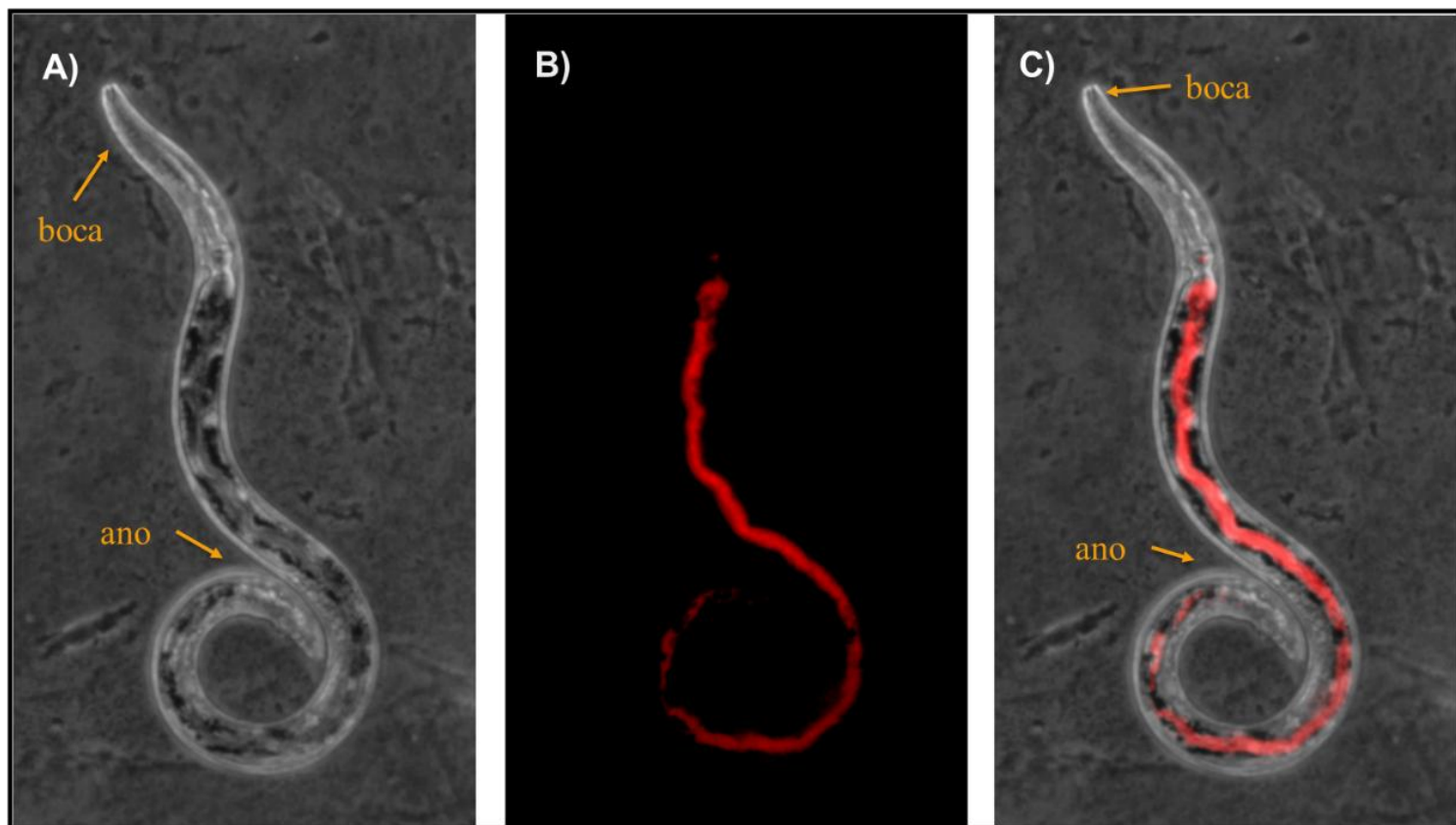


Figura 22. El nematodo *O. myriophila* alimentado con la cepa MC5-R 337R e inmobilizado en Agarosa al 10% en el microscopio de fluorescencia a 40X. A) Nematodo en campo claro B) Nematodo en el campo de fluorescencia a 532nm C) Nematodo traslapado con el programa ImageJ para localización de la fluorescencia

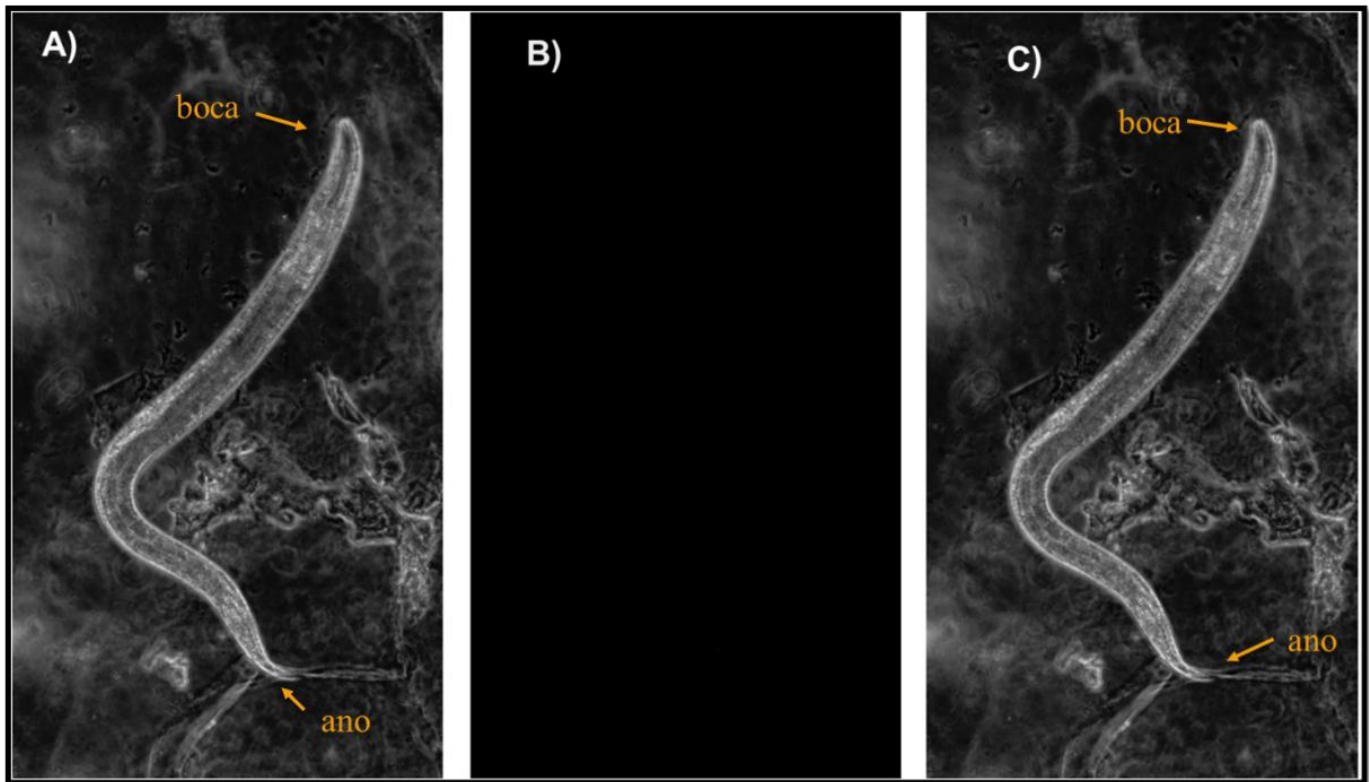


Figura 23. El nematodo *O. myriophila* alimentado con la cepa MC5-R nativa e inmobilizado en Agarosa al 10% en el microscopio de fluorescencia a 40X. A) nematodo en campo claro B) Nematodo en el campo de fluorescencia a 532nm C) Nematodo traslapado con el programa ImageJ para localización de la fluorescencia.

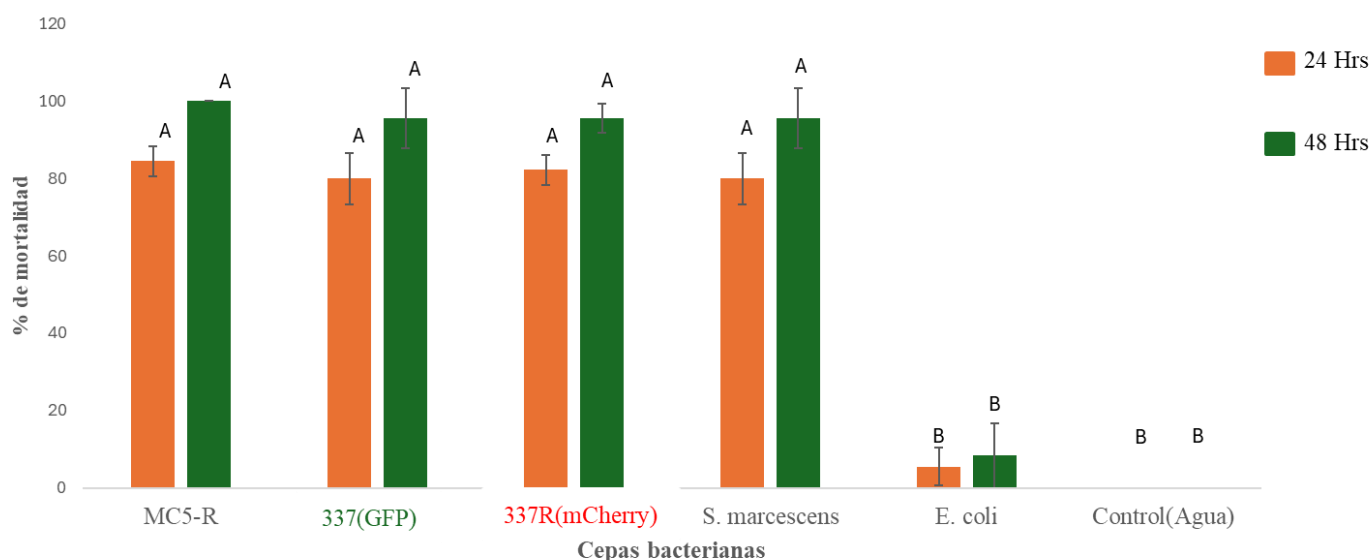
8.6 Bioensayos de patogenicidad de la cepa MC5-R (337/337R)

Para evaluar que la cepa transformada con el vector pSVA337 o 337R siguen siendo patógenas se realizaron los bioensayos de patogenicidad por inyección utilizando una dosis de 10^5 células/larva, esta se inyectó directamente en el hemocele de la larva, posteriormente, el porcentaje de mortalidad se registró a las 24 y 48 horas; como control positivo se utilizó *S. marcescens* y como control negativo se utilizó *Escherichia coli* ATCC (cepa no patógena) y agua destilada estéril.

A las 24 horas se obtuvieron porcentajes de mortalidad de hasta 84.44% para la cepa MC5-R(nativa) y 79.99% para las cepas MC5-R337(GFP) y *S. marcescens*, para la cepa MC5-R337R(mCherry) fué del 82.22%. En el caso de los controles negativos *E. coli* y agua

estéril fué del 5.55% y 0% respectivamente. Aunque la cepa de *E. coli* no es una cepa patógena se puede observar una baja mortalidad, lo cual se puede deber a que la dosis administrada es una dosis alta, por otra parte, las larvas muertas tanto para la cepa nativa como para las transformadas (GFP y mCherry) presentaban un color rojizo más intenso que las larvas muertas de la cepa *S. marcescens*, mientras que las de la cepa *E. coli* mostraban una coloración oscura; en el caso de las larvas para las cuales se utilizó agua destilada estéril se observó que estas tenían menos alimento indicando que su apetito no se vio modificado por la inyección.

Por otro lado, a las 48 horas se obtuvo un porcentaje de mortalidad de hasta 100% para la cepa MC5-R(nativa) y de 95.55% para las cepas MC5-R transformadas con el vector pSVA y *S. marcescens*, en el caso de *E. coli* se obtuvo una mortalidad de 8.33% y del 0% para el agua estéril. Cabe destacar que se realizó un análisis de varianza, el cual indica que no existen diferencias significativas en los porcentajes de mortalidad de la cepa MC5-R y las cepas transformadas con el vector pSVA (337/337R), indicando que la inserción del vector no influye en la patogenicidad de la bacteria. También se observó que el porcentaje de mortalidad que presentó la cepa nativa es el mismo que obtuvo Cruz en el 2018 utilizando la misma dosis de 10^5 células/larva de *G. mellonella* indicando que la cepa conserva su patogenicidad.



Grafica 3. Porcentaje de mortalidad \pm Desviación Estándar de los bioensayos de patogenicidad por inyección a las 24 y 48 horas a una dosis de 10^5 células/larvas. ANOVA y prueba de Tukey *Letras iguales no presentan diferencias significativas ($P < 0.05$) *.

8.7 Secuenciación del genoma de la cepa MC5-R

Para la identificación de la cepa MC5-R, primero se realizó la extracción del DNA y se verificó la integridad de este en un gel de Agarosa al 1% (Figura 24) y se mandó a secuenciar a la compañía BGI- Inomics LATAM REG, la identificación la realizaron el grupo de trabajo del Laboratorio de Genómica Evolutiva del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM. La cepa MC5-R fue identificada como *Serratia marcescens*, para esto primero realizaron un GDTB-k en el que mostró similitud con *S. marcescens*, *S. bockelmanii* y *S. nematodiphila*; Posteriormente esto fue utilizado para realizar un Py-ANI (Figura 25) en la cual la cepa MC5-R no mostró similitud con *S. bockelmanii* y *S. nematodiphila*, agrupándose dentro de *S. marcescens*. Finalmente se realizó un pangenoma y el árbol filogenético correspondiente (Figura 26).

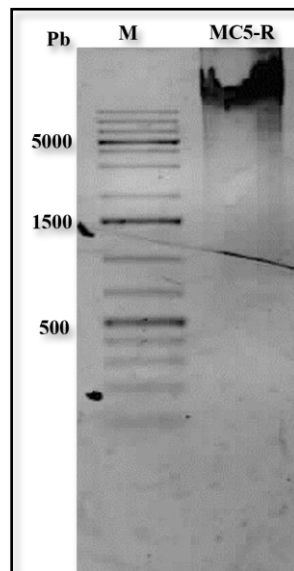


Figura 24. Gel de Agarosa de la extracción de ADN de la cepa MC5-R tomada con el G: Box transiluminador.

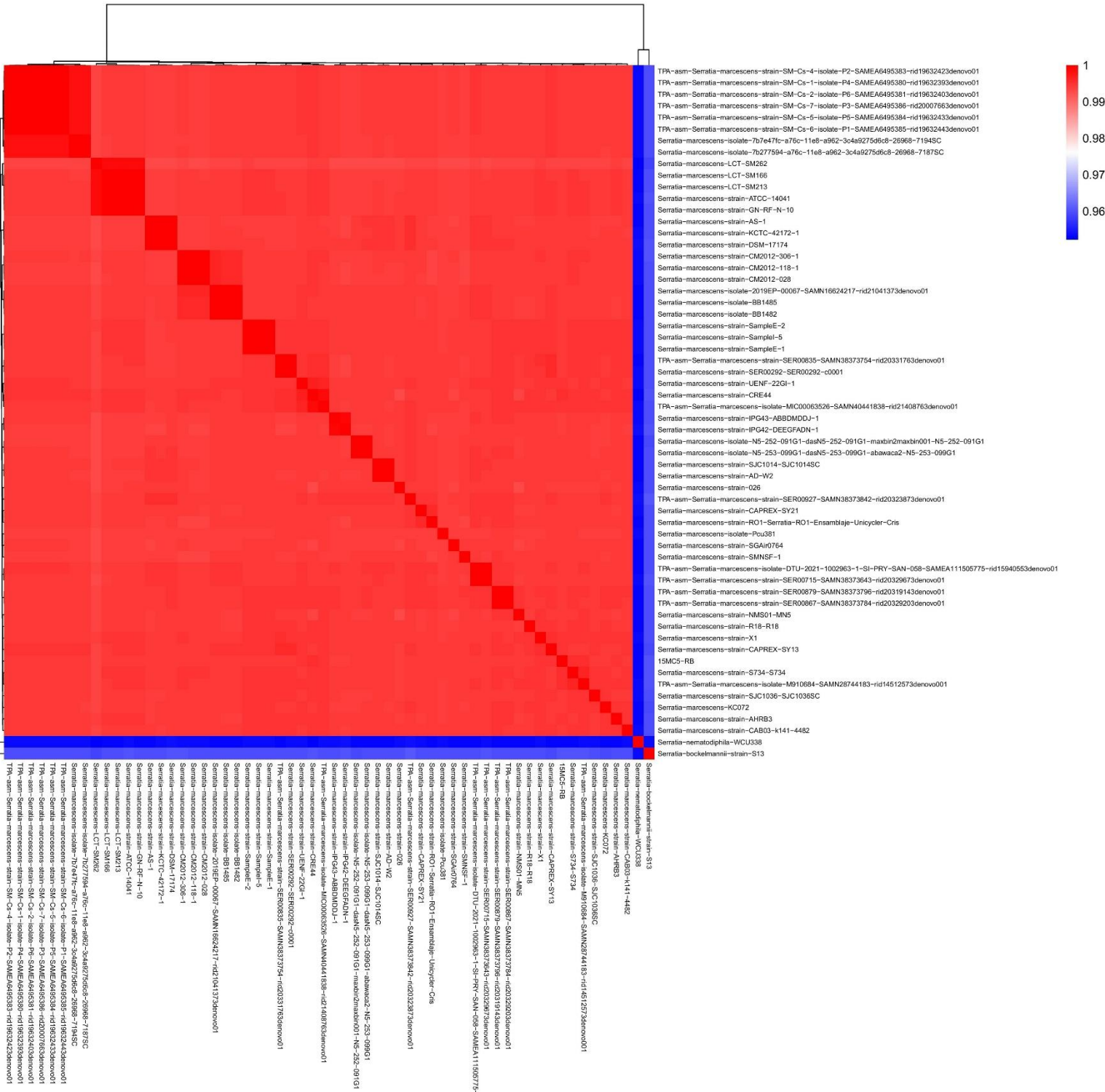


Figura 25. Average Nucleotide Identity (ANI) de la cepa MC5-R

Tree scale: 0.01



Figura 26. Árbol filogenético de la cepa MC5-R

8.8 Obtención de un cultivo axénico del nematodo *Oscheius myriophila*

La obtención de un cultivo axénico de *O. myriophila* permitió aislar nematodos libres de su bacteria nativa mediante la producción de huevos axénicos. El co-cultivo inicial de *O. myriophila* con la cepa MC5-R, incubado durante tres días, mostró la presencia de hembras grávidas (Figura 27) y huevos a partir de las 48 h, con un incremento notable entre las 60 y 72 h de incubación. Una vez detectados estos estadios, los nematodos fueron recuperados y sometidos a lavados sucesivos con agua estéril, logrando la eliminación de residuos visibles. El tratamiento con solución de lisis de huevos seguido de centrifugación permitió la disolución de la cutícula externa de las hembras grávidas y la separación eficiente de los huevos. Los lavados posteriores con soluciones reguladoras de fosfatos, agua destilada estéril y la mezcla de antibióticos aseguraron la eliminación de posibles contaminantes microbianos. Los huevos obtenidos, incubados en placas con medio de huevo alcalino entre 96 y 120 horas, presentaron la eclosión de juveniles viables, los cuales lograron desarrollarse hasta Juveniles infectivos. No se detectó crecimiento bacteriano visible durante el periodo de incubación, lo que sugiere la eficacia del protocolo para la eliminación de la microbiota nativa.

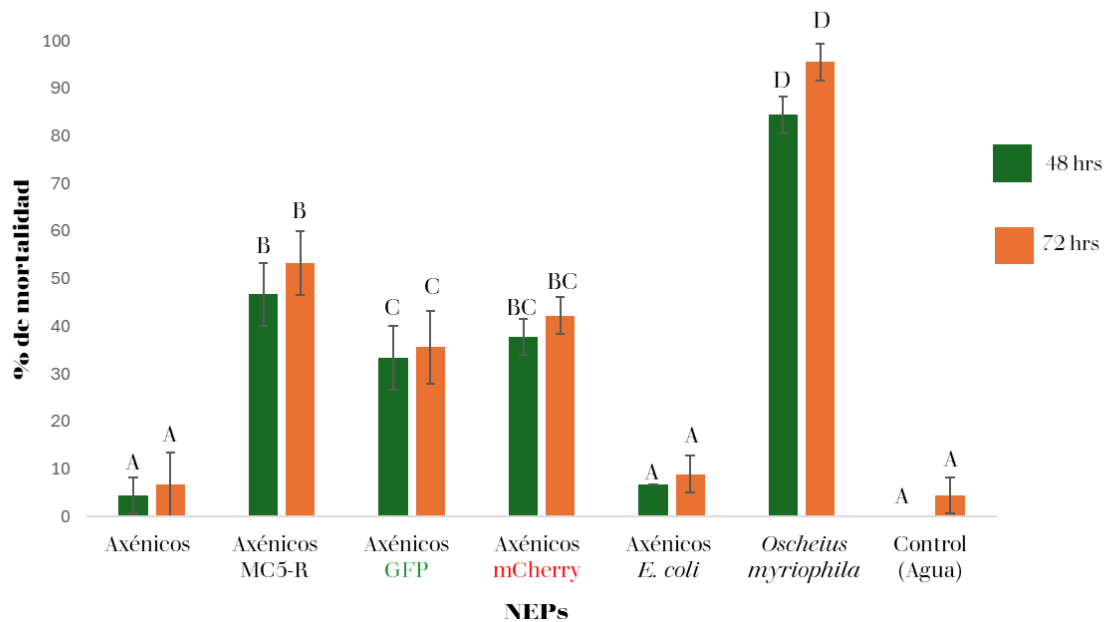


Figura 27. Hembra Grávida expulsando huevos a la 96 horas.

8.9 Evaluación de la patogenicidad del nematodo *Oscheius myriophila*

Para evaluar el papel que juega la bacteria simbiote en la patogenicidad del nematodo *O. myriophila*, se infectaron larvas de *G. mellonella* con los JI axénicos obtenidos y alimentados con la bacteria simbiote transformada (GFP y mCherry) y sin transformar (MC5-R), posteriormente, el porcentaje de mortalidad se registró a las 48 y 72 h; como control positivo se utilizó el nematodo *O. myriophila* silvestre y como control negativo se utilizó *Escherichia coli* ATCC (cepa no patógena) y agua destilada estéril.

A las 48 horas los nematodos axénicos mostraron porcentajes de mortalidad de hasta 4.44%, en comparación con el 84.44% de los nematodos de la cepa silvestre (*O. myriophila*), mientras que los nematodos alimentados con la cepa MC5-R 46.66%, para las cepas MC5-R337(GFP) y para la cepa MC5-R337R(mCherry) fué del 33.33% y 37.77% respectivamente. En el caso de los controles negativos, *E. coli* mostró el 6.66% y el control de agua estéril fue del 0%. Aunque los nematodos se alimentaron con su cepa simbiote se puede observar que su patogenicidad no es igual a los nematodos silvestres esto puede deberse a que la bacteria ya no logró adaptarse al intestino del nematodo o el nematodo a la bacteria. De igual forma, a las 72 h se observa un porcentaje de mortalidad de hasta 6.66% para los nematodos axénicos y de 95.55% para los nematodos de la cepa silvestre, en el caso de los nematodos alimentados con la cepa MC5-R el 53.33%, para las cepas MC5-R337(GFP) y para la cepa MC5-R337R(mCherry) fué del 35.55% y 42.22% respectivamente. En el caso de los controles negativos con *E. coli* se obtuvo una mortalidad de 8.88% y del 4.44% para el agua estéril. Cabe destacar que se realizó un análisis de varianza, en el cual se observan diferencias significativas en los porcentajes de mortalidad de los nematodos axénicos y silvestres, indicando que *S. marcescens* como bacteria simbiote juega un papel importante en la patogenicidad del nematodo *O. myriophila*.



Grafica 4. Porcentaje de mortalidad \pm Desviación Estándar de los bioensayos de patogenicidad de los nematodos axénicos. ANOVA y prueba de Tukey *Letras iguales no presentan diferencias significativas ($P < 0.05$).

8.10 Propagación del nematodo *Oscheius myriophila* *in vivo* e *in vitro*

Como resultado de la búsqueda intensiva de medios de cultivo eficientes para la alimentación y obtención de nematodos axénicos que nos permitieran evaluar que la patogenicidad del nematodo está asociada únicamente a la bacteria MC5-R, se evaluó la propagación del nematodo *O. myriophila in vivo* mediante la utilización de larvas de *G. mellonella* e *in vitro* utilizando Medio de Huevo y Medio Lipid-Agar (Anexo 4). En el caso del método *in vivo* consistió en infectar 5 larvas de *G. mellonella* con 100, 500 y 1000JI para después recolectar los JI mediante la utilización de trampas White y contabilizarlos. Los métodos *in vitro* Medio de Huevo y Lipid-Agar consistieron en colocar en 5 cajas de cada medio de cultivo con 100, 500 y 1000JI, para después recolectarlos y cuantificar los JI. Los métodos se evaluaron durante solo 15 días, esto debido a que después de este periodo los métodos *in vitro* se observaban deshidratados.

A los 15 días se observó que la mayor producción de NEPs partía del inóculo de 100JI (Tabla 3), esto debido a la mayor disponibilidad de nutrientes presentes en cada uno de los métodos, sin embargo, la propagación fue más lenta a comparación del inóculo de 1000JI

(Tabla 5), en donde se observó menor producción, pero con tiempos de propagación más rápidos.

Tabla 3. Propagación del nematodo *Oscheius myriophila* con un inóculo inicial de 100JI con diferentes métodos.

Método de propagación	Número de JI Promedio ± DE
<i>G. mellonella</i>	21046 ± 1886.51778 A
Medio de huevo	42660 ± 2306.34025 B
Medio Lipid Agar	25488 ± 3240.95541 A

* Juveniles Infecciosos (JI) ± Desviación Estándar (DE). ANOVA y prueba de Tukey. Letras iguales no presentan diferencias significativas (P<0.05) *.

Tabla 4. Propagación del nematodo *Oscheius myriophila* con un inóculo inicial de 500JI con diferentes métodos.

Método de propagación	Número de JI Promedio ± DE
<i>G. mellonella</i>	16755 ± 1265.70191 A
Medio de huevo	31592 ± 1061.17671 B
Medio Lipid Agar	22389 ± 409.611198 C

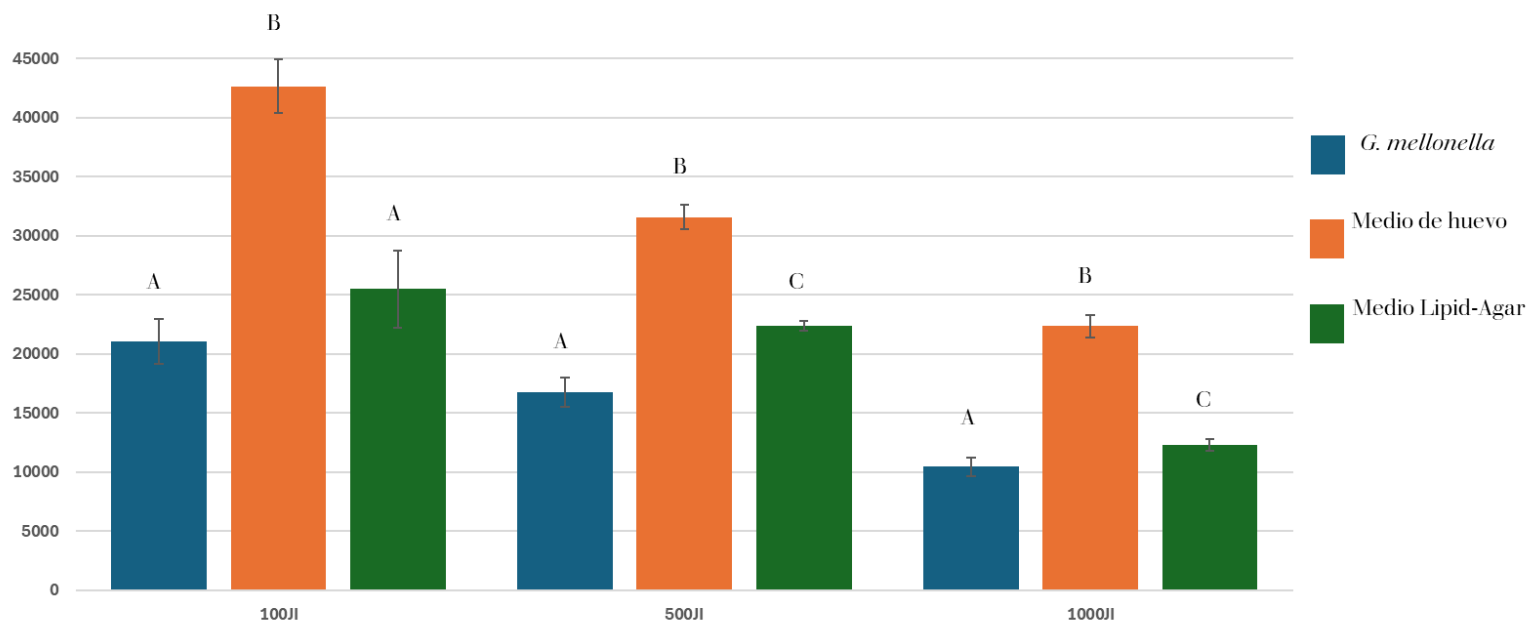
* Juveniles Infecciosos (JI) ± Desviación Estándar (DE). ANOVA y prueba de Tukey. Letras iguales no presentan diferencias significativas (P<0.05) *.

Tabla 5. Propagación del nematodo *Oscheius myriophila* con un inóculo inicial de 1000JI con diferentes métodos.

Método de propagación	Número de JI Promedio ± DE
<i>G. mellonella</i>	10439 ± 743.758922 A
Medio de huevo	22339 ± 918.878302 B
Medio Lipid Agar	12287 ± 479.705465 C

* Juveniles Infecciosos (JI) ± Desviación Estándar (DE). ANOVA y prueba de Tukey. Letras iguales no presentan diferencias significativas (P<0.05) *.

El método con mayor producción de NEPs fué el Medio de huevo con un promedio de 42660JI (Grafica 4) en 15 días partiendo de un inóculo de 100JI, considerando que la producción de 1 caja de este cultivo es de 2.84 pesos en comparación con el método utilizando *G. mellonella* en donde el promedio de producción de NEPs es de 16755JI por larva con un costo de 3.21 pesos por larva, se puede considerar más eficiente la utilización del Medio de huevo para la propagación de este nematodo *O. myriophila*.



Grafica 5. Numero de NEPs producidos en diferentes métodos \pm Desviación Estándar a diferentes concentraciones de JI. ANOVA y prueba de Tukey *Letras iguales no presentan diferencias significativas ($P < 0.05$) *.

9. Discusión

Los nematodos entomopatógenos (NEPs) han demostrado ser herramientas eficaces en el control biológico de plagas agrícolas, destacando su potencial por la relación simbiótica que mantienen con bacterias que son fundamentales para su patogenicidad. En este estudio se identificó y caracterizó la cepa simbiote *S. marcescens* MC5-R asociada al nematodo *O. myriophila*, confirmando su identidad mediante secuenciación del genoma. La localización intracorporal de estas bacterias juega un papel clave en su eficacia como agentes de control, debido a su influencia tanto en la infección del hospedero como en la reproducción del nematodo.

La localización de *S. marcescens* MC5-R a lo largo de todo el tracto intestinal de *O. myriophila* concuerda con lo previamente reportado para otras asociaciones simbióticas como la de *Serratia* sp. en *C. briggsae* (Abebe et al., 2011). Esta distribución fue confirmada mediante el marcaje con proteínas fluorescentes (GFP y mCherry), técnica que ha demostrado ser útil en estudios de localización bacteriana, especialmente cuando las bacterias presentan pigmentos naturales que podrían interferir con la fluorescencia, como ocurre en el caso de *Serratia*. La mCherry mostró una buena estabilidad térmica y fotónica, confirmando su utilidad en este tipo de estudios, aunque también se reconocieron sus limitaciones ante exposiciones prolongadas a temperaturas superiores a 40 °C (Shaner et al., 2004).

Un aspecto relevante observado en este trabajo es la importancia de las técnicas de inmovilización para la visualización de fluorescencia. Mientras que métodos tradicionales como el uso de formaldehído al 4% y antiparasitarios como el levamisol son ampliamente utilizados, en este estudio se demostró que pueden resultar perjudiciales para la viabilidad del nematodo y la integridad de la fluorescencia. La exposición de *O. myriophila* a levamisol al 0.075% resultó en mortalidades de hasta 76.66% cuando se combinaron con el calor del microscopio óptico, indicando una alta sensibilidad de esta especie al compuesto. Asimismo, la fijación con formol salino afectó negativamente la fluorescencia, especialmente de la GFP, lo que ya ha sido reportado previamente por Tsien (1998) y Bancroft y Gamble (2008). Por lo tanto, se propone el uso de agarosa al 10% como una técnica menos agresiva y eficaz para inmovilizar nematodos vivos, permitiendo la observación en tiempo real sin comprometer la fluorescencia.

Otro punto crítico abordado fue la evaluación del impacto de la transformación bacteriana con plásmidos fluorescentes sobre la virulencia. Diversos estudios advierten que la expresión de proteínas fluorescentes puede generar una carga metabólica significativa que afecte la patogenicidad bacteriana (Liu y Grewal, 2007; Ciche y Ensign, 2003). Sin embargo, los bioensayos realizados en larvas de *G. mellonella* mostraron que las cepas transformadas de *S. marcescens* (con GFP y mCherry) mantienen niveles de mortalidad similares a la cepa nativa, tanto a las 24 como a las 48 h post-inoculación.

Estos resultados indican que, en este caso, la transformación con el plásmido pSVA no afecta significativamente la capacidad infectiva de la bacteria, lo cual es un hallazgo relevante para su uso en estudios posteriores o en aplicaciones biotecnológicas.

Finalmente, este estudio proporciona evidencia sólida sobre la viabilidad de utilizar proteínas fluorescentes para estudiar la interacción entre nematodos y sus bacterias simbiotes. Además, resalta la importancia de optimizar las condiciones experimentales para evitar artefactos que puedan alterar la interpretación de los resultados, particularmente en lo referente a la visualización de fluorescencia y la evaluación de la virulencia.

Los resultados obtenidos muestran de manera clara que *S. marcescens* es fundamental para que *O. myriophila* pueda actuar como un nematodo entomopatógeno eficaz. Al eliminar su microbiota nativa mediante la obtención de huevos axénicos, observamos que su patogenicidad en *G. mellonella* se redujo drásticamente, de más del 95% de mortalidad en la cepa silvestre a menos del 10% a las 72 horas. Este cambio nos muestra que la bacteria no es un elemento accesorio, sino que juega un papel importante en la patogenicidad del nematodo.

Cuando se volvió a introducir a *S. marcescens* (MC5-R) en nematodos axénicos, la mortalidad se recuperó parcialmente, alcanzando un 53.33%. Esto demuestra que la bacteria sigue desempeñando un papel crucial en el proceso de infección, aunque la recolonización no logra restablecer del todo la interacción original. La falta de adaptación de la bacteria al intestino del nematodo o la pérdida de ciertas condiciones fisiológicas por parte del nematodo podrían explicar esta disminución. En el caso de las bacterias marcadas con GFP o mCherry, los valores de mortalidad fueron aún menores, lo que sugiere que la modificación genética puede alterar, aunque sea ligeramente, la recolonización en el nematodo.

Desde una perspectiva evolutiva, los resultados obtenidos aportan a la idea de que *O. myriophila* proviene de un ancestro saprofítico que habitaba en ambientes ricos en materia orgánica en descomposición, donde bacterias como *Serratia* eran abundantes (Trejo, *et al.*, 2024). Probablemente, esta fue una interacción crucial entre el nematodo y la bacteria, por otro lado, en un contexto necroménico la presión de la competencia microbiana y la necesidad de evadir las defensas de los insectos favorecieron una asociación entre estos microorganismos. Con el tiempo, esta relación se convirtió en una alianza funcional, aunque no tan específica como la de *Steinernema–Xenorhabdus* y *Heterorhabditis–Photorhabdus*.

De forma que *O. myriophila* puede verse como un entomopatógeno facultativo, situado en un punto intermedio en la evolución de los entomopatógenos. La pérdida de su simbionte lo devuelve a un comportamiento más cercano al de un oportunista saprofítico, mientras que su presencia le permite comportarse como un patógeno eficaz. La asociación bacteria- nematodo juega un papel importante para el desarrollo y utilización de nematodos entomopatógenos como agentes de control biológico de plagas (Trejo, *et al.*, 2024). Algo importante si consideramos que, aunque *O. myriophila* y otros nematodos afines han demostrado la capacidad de localizar y matar insectos hospedadores, en algunos casos la ausencia de información ha generado dudas sobre su verdadera naturaleza entomopatógena (Sudhaus, 2010; Trejo, *et al.*, 2024). Lo que nuestros resultados confirman es que por sí solo *O. myriophila* no mata, necesita a su bacteria para ser patógeno.

En este trabajo también se evaluaron diferentes estrategias para la propagación de *O. myriophila*, comparando un método *in vivo*, basado en la infección de larvas de *G. mellonella*, y dos métodos *in vitro*, utilizando Medio de Huevo y Medio Lipid-Agar. Esto con el objetivo de determinar cuál de ellos ofrece mejores resultados en términos de producción, viabilidad e infectividad del nematodo, y así identificar la opción más adecuada para su posible uso en el control biológico.

Los resultados mostraron que el Medio de Huevo fue el método más eficiente en producción, alcanzando un promedio de 42,660 JI en 15 días con un inóculo inicial de 100 JI, superando al método *in vivo* con *G. mellonella* (21,046 JI) y al Medio Lipid-Agar (25,488 JI). Este rendimiento puede deberse a la mayor disponibilidad y estabilidad de nutrientes que ofrece

este medio, así como por las condiciones controladas que reducen la competencia microbiana y el estrés para los nematodos (Ehlers, 2001; Kaya y Gaugler, 1993).

También se observó que, aunque los inóculos más grandes (1000 JI) permitieron una propagación más rápida, la producción total fue menor, probablemente debido a la competencia por recursos y al agotamiento temprano del medio, algo común en la propagación de NEPs (Bedding, 1984).

Desde el punto de vista económico, el Medio de Huevo resultó más rentable, con un costo de 2.84 pesos por caja frente a los 3.21 pesos por larva en el método *in vivo*, lo que lo convierte en una alternativa viable para producciones a gran escala. Sin embargo, el uso de *G. mellonella* sigue teniendo valor cuando se requiere evaluar la infectividad en un hospedador real, especialmente en ensayos de patogenicidad, esto debido a que la ausencia del hospedador y de la presión selectiva natural podría afectar la virulencia y la estabilidad de la simbiosis con las bacterias simbiotes (Ehlers, 2001; Kaya y Gaugler, 1993).

Estos resultados muestran la importancia de disponer de un método *in vitro* eficiente que no solo facilita la producción masiva del nematodo, sino que también permite obtener nematodos axénicos, que ayudan a confirmar que la patogenicidad de *O. myriophila* está asociada únicamente a su bacteria simbiote *S. marcescens* (Sudhaus, 2010; Trejo, et al., 2024).

En conclusión, el Medio de Huevo representa una opción más eficiente y económica para la propagación de *O. myriophila* en comparación con el método *in vivo* y el Medio Lipid-Agar, siendo una técnica eficaz en la propagación de nematodos dirigidos a ser utilizados como agentes de control biológico teniendo en cuenta sus limitaciones.

10. Conclusiones

Los resultados obtenidos demuestran con claridad la importancia que desempeña la asociación simbiótica entre el nematodo *O. myriophila* y la bacteria *S. marcescens* en la eficacia entomopatógena del nematodo. La identificación y caracterización genética de la cepa simbiote confirmaron su identidad y su relevancia funcional dentro de esta interacción. Un aspecto importante de este trabajo fue la localización de la bacteria, distribuida a lo largo de todo el tracto intestinal del nematodo, lo que permite una liberación rápida y efectiva al momento de la infección del hospedero. Esta disposición estratégica influye directamente en la colonización y la superación de las defensas inmunes del insecto, así como en la reproducción del nematodo dentro del hospedero, destacando así la importancia de la bacteria como componente esencial de la patogenicidad.

En cuanto el análisis de la localización bacteriana, el uso de proteínas fluorescentes mostró ser una herramienta eficaz. Destacando el uso de la proteína mCherry ya que esta ofreció mejores resultados que la GFP al ser más estable, lo cual facilitó la observación en el microscopio de fluorescencia. Asimismo, se evaluaron distintas técnicas de inmovilización, demostrando que la agarosa al 10 % es la alternativa más adecuada para mantener la viabilidad de los nematodos sin causar daños a la fluorescencia, en contraste con métodos tradicionales como el uso de levamisol o formaldehído.

En cuanto al efecto de la transformación bacteriana con vectores fluorescentes, se observó que la introducción del plásmido pSVA no afectó significativamente la patogenicidad de *S. marcescens*, ya que las cepas transformadas mantuvieron niveles de mortalidad comparables a la cepa nativa en bioensayos con *G. mellonella*. Por otra parte, la eliminación de la microbiota nativa en nematodos axénicos provocó una disminución significativa de la patogenicidad, demostrando que la bacteria simbiote no es un elemento accesorio, sino un factor indispensable para que *O. myriophila* actúe como entomopatógeno. La recolonización con la cepa simbiote recuperó parcialmente la patogenicidad, aunque sin alcanzar los niveles originales, lo que sugiere que existen factores de adaptación que regulan la interacción bacteria-nematodo.

Finalmente, se determinó que el Medio de Huevo representa la mejor opción para la propagación masiva de *O. myriophila*, ya que ofrece altos rendimientos de juveniles infectivos en menor tiempo y con un costo reducido en comparación con métodos tradicionales como el uso de *G. mellonella*. Esta técnica *in vitro* no solo facilita la producción a gran escala, sino que también permite obtener nematodos axénicos, fundamentales para estudios de interacción simbiótica y control de calidad biológica.

11. Literatura

Abebe, E., Akele, F., Morrison, J., Cooper, V. y Thomas, K. 2011. An insect pathogenic symbiosis between *Caenorhabditis* and *Serratia*. *Virulence*. 2(2): 158-161.

Akhurst, J. 1986. *Xenorhabdus nematophilus* subsp. *poinarii*: its interaction with insect pathogenic nematodes. *Systematic and Applied Microbiology* 8: 142-147.

Baker, G.L. y Capinera, J.H. 1997. Nematodes and nematomorphs as control agents of grasshoppers and locusts. *Memiors of the Entomological Society of Canada*, 171,157-211

Castro, I. 2020. Aislamiento, identificación y evaluación de tres cepas de nemátodos entomopatógenos en cultivos de caña de azúcar en Morelos. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. 14, 22-30.

Ciche, T. A., Darby, C., Ehlers, R., Forst, S. y Goodrich-Blair, H. 2006. Dangerous liaisons: The symbiosis of entomopathogenic nematodes and bacteria. *Biological Control*. 38: 22-46.

Cruz, K. 2018. Aislamiento y caracterización de las bacterias simbiotes de los nemátodos entomopatógenos *Heterorhabditoides chongmingensis*, *Oscheius myriophila* y *Caenorhabditis brenneri*. Tesis de Maestría, Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos

Cubillas, G., y Flores, Y. 2016. Potencialidad y Retos del Uso de Nematodos Entomopatógenos para el Control Biológico de Plagas. I: Control biológico mediante una asociación simbiótica NEP- Bacteria. *INVURNUS*, 11(1), 27–36.

Coupland, J.A., Abd-Elgawad, M.M. y Askary, T.H. 2017. Beneficial nematodes and the changing scope of crop protection. In: Abd-Elgawad, M.M., Askary, T.H. & Coupland J, A. (Eds.) *Biocontrol Agents: Entomopathogenic and Slug Parasitic Nematodes*. (pp. 26-42). 660 p. Wallingford, UK: CAB International.

Cuthbertson, A., Head, J., Walters, K., y Gregory, S. 2003. The efficacy of the entomopathogenic nematode, *Steinernema feltiae*, against the immature stages of *Bemisia tabaci*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 83(3), 267–269.

Cowles, E., y Goodrich-Blair, H. 2008. The *Xenorhabdus nematophila* nilABC genes confer the ability to colonize *Steinernema carpocapsae* nematodes. *Molecular Microbiology*, 69(3), 722–735.

García, C. 2009. Manual de técnicas para el aislamiento, identificación y caracterización de hongos y nematodos entomopatógenos. México: IPN.

Georgis, R. y Poinar, G.O. 1983. Effect of soil textures on the distribution and infectivity of *Neoplectana glaseri* (Nematode: Steinernematidae) *Journal Nematology*, 15, 329-332.

Grifaldo, A.F., Alatorre, R.R., Segura, L.O., y Hernández, R.F. 2010. *Steinernema ralatorein*. sp. isolated from sugarcane areas at Veracruz, Mexico. *Source Southwestern Entomologist*. 42:171-190.

Grijalba, E., Hurst, M. R. H., Ibarra, J. E., Jurat-Fuentes, J. L., & Jackson, T. A. (2018). Bacterias entomopatógenas en el control biológico de insectos. *Control biológico de plagas en México* (pp. 233–258).

De-Jun, H., Zhen-huan, G., Zhuang, Q., y Hua, L. 2001. Advance of entomopathogenic nematodes. *Journal of Forestry Research*, 12(4), 257–262.

Dunphy, C., y Thurston, G. 1990. Insect immunity. In: Gaugler, R: Kaya. HK. Eds. *Entomopatho-genic Nematodes in Biological Control*. CRC Press. Boca Raton.

Fimbres, G., y Flores, Y. 2016. Potencialidad y Retos del Uso de Nemátodos Entomopatógenos para el Control Biológico de Plagas. I: Control biológico mediante una asociación simbiótica. *Invurnus*, 11(1), 27–36.

Fischer, M., Viallard, V., Brunel, B., Normand, P., y Boemare, N. 1999. Polyphasic classification of the genus *Photorhabdus* and proposal of new taxa: *P. luminescens* subsp., *P. luminescens* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *akhurstii* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *laumondii* subsp. nov., *P. temperata* sp. nov., *P. temperata* subsp. *temperata* subsp. nov. and *P. asymbiotica* sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, 49(4), 1645–1656.

France, A., Luppichini, P., Urtubia, I., Olivares, N., y Rodríguez, F. 2013. Manejo del Burrito de la vid, *Naupactus xanthographus* (Germar) y otros curculiónidos asociados a vides. Boletín INIA, 1(260), 17–23.

Fujie, A, y Yokoyama, T. 1998. Effects of ultraviolet light on the entomopathogenic nematode, *Steinernema kushidai* and its symbiotic bacterium, *Xenorhabdus japonicus*. Applied Entomology and Zoology, 33 (22), 263-264.

Grifaldo, P., 2010. Incidencia de nemátodos entomopatógenos en áreas cañeras de Veracruz y su interacción con el barrenador de la caña de azúcar *Diatraea saccharalis*. Tesis de Maestría. Colegio de posgraduados. Pp 88-90

Goodrich, H., y Clarke, D. 2007. Mutualism and pathogenesis in *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: Two roads to the same destination. Molecular Microbiology, 64(2), 260–268. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05671.x>

Gonzalez, M., 2006. Presencia, identificación y patogenicidad de nemátodos entomopatógenos (Rhabditidae: Heterorhabditidae, Steinernematidae) aislados de suelos del Pacífico Centro Mexicano. Universidad de Colima.

Grewal, P., Matsuura, M., y Converse, V. 1997. Mechanisms of specificity of association between the nematode *Steinernema scapterisci* and its symbiotic bacterium. Parasitology, 114(5), 483–488.

Han, R., y Ehlers, R. 1998. Cultivation of axenic *Heterorhabditis* spp. dauer juveniles and their response to non-specific *Photorhabdus luminescens* food signals. *Nematologica*, 44(4), 425–435.

Jurat, J., y Jackson, T. 2012. Bacterial entomopathogens. *Insect Pathology*, 1(1), 265–349.

Kaya, H., y Gaugler, R. 1993. Nematodos entomopatógenos. *Revisión Anual de Entomología*, 38(1), 181–206.

Kaya, K. y Hara, H. 1981. Susceptibility of various species of lepidopterous pupae to the entomogenous nematode *Neoplectana carpocapsae*. *Journal of Nematology*. 13 (3): 291-294.

Martens, C., y Goodrich-Blair, H. 2005. The *Steinernema carpocapsae* intestinal vesicle contains a subcellular structure with which *Xenorhabdus nematophila* associates during colonization initiation. *Cellular Microbiology*, 7(12), 1723-1735.

Murfin, E., Chaston, J., y Goodrich-Blair, H. (2012). Visualizing bacteria in nematodes using fluorescent microscopy. *Journal of Visualized Experiments*, (68), e4298. <https://doi.org/10.3791/4298>

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

Poinar, G., y Thomas, G., 1966. Significance of *Achromobacter nematophilus* Poinar and Thomas (Achromobacteraceae: Eubacteriales) in the development of the nematode, DD-136 (*Neoplectana* sp. Steinernematidae). *Parasitology*, 56(2), 385–390.

Poinar, G., Thomas, G., y Hess, R. 1977. Characteristics of the specific bacterium associated with *Heterorhabditis bacteriophora* (Heterorhabditidae: Rhabditida). *Nematologica*, 23(1), 97–102.

Poinar, O. y Veremtshuk, V., 1979. A new strain of entomopathogenic nematodes and geographical distribution of *Neoplectana carpocapsae* Weiser (Rhabditida, Steinernematidae) *Zoological Journal*.49:966–969.

Polack, A., Lecuona, E., y López, N. 2020. Control biológico de plagas en horticultura. Experiencias argentinas de las últimas tres décadas. Ediciones INTA. Ciudad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

Rodríguez, M. 2019. Caracterización de aislados nativos de nematodos entomopatógenos y uso potencial contra *Spodoptera frugiperda* Tesis de maestría, Universidad Nacional Agraria. <https://repositorio.una.edu.ni/3830/>

Shapiro D., Gaugler R. y Lewis E., 2003. *In vivo* production of entomopathogenic nematodes. *International Journal of Nematology*, 14 (1): 13-18.

Stock, P., 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.

Stuart, R., y Gaugler, R. 1994. Patchiness in populations of entomopathogenic nematodes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 64(1), 39–45.

Sudhaus, W. 2010. Phoresy, necromeny, and the evolution of parasitism in nematodes. *Nematology*, 12(6), 1–14.

Trejo, J., Ibarra, J., y Contreras, J. 2024. The evolution of entomopathogeny in nematodes. *Ecology and Evolution*, 14.

Uribe, L., Mora, M., y Stock, S. 2005. First record of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Costa Rica. *Journal of Invertebrate Pathology*, 88(3), 226–231

Vivas, I., y Goodrich-Blair, H. 2001. *Xenorhabdus nematophilus* as a model for host-bacterium interactions: rpoS is necessary for mutualism with nematodes. *Journal of bacteriology*, 183(16), 4687–4693.

Wellington, S., Pilz-Júnior, L., Heermann, R., y Da Silva, S. 2020. The great potential of entomopathogenic bacteria *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* for mosquito control: a review. *Parasites and vectors*, 13, 1-14.

12. Anexos

Anexo 1. PROTOCOLO PARA ELECTROPORACIÓN

Preparación de electrocompetente

1. Cultivar en 7ml en medio líquido LB la cepa de interés hasta que alcance una DO_{600nm} 0.7-0.9
2. Repartir el cultivo celular en 4 tubos de 1.5ml
3. Obtener el pellet centrifugado a $8,000 \times g$ / 2 min y descartando el sobrenadante
4. Adicionar a cada tubo 1ml de sacarosa 300mM y resuspender el pellet
5. Centrifugar a $8,000 \times g$ / 2 min y eliminar sobrenadante
6. Repetir paso 4 y 5 dos veces más
7. Adicionar 50ul de sacarosa a cada tubo
8. Si no se utilizan todos, guardar a -20 o $-80^{\circ}C$

Electroporación

Tomar 1 tubo por cada electroporación y 1 tubo para control

Si las células competentes estaban congeladas, dejar descongelar en hielo (10 min)

9. Tubo 1: agregar 600ng-800ng de plásmido de interés
10. Tubo 2: agregar el mismo volumen, pero de agua estéril
11. Dejar reposar en hielo 5 min
12. Trasvasar las células con el plásmido en una cubeta verde para electroporar y colocar en hielo (importante: verificar que la muestra se reparta homogéneamente al fondo de la celda y que no queden burbujas)
13. Encender el electroporador y programar el pulso según el color de la celda utilizada (así está programado en el lab, pero puedes darle el pulso que le dan a las E. coli de tu lab o buscar en internet lo que se utiliza para Serratia)
 - a. Ec1 → 1.8kV para celda café
 - b. Ec2 → 2.5kV para celda verde
14. Sacar la cubeta del hielo y secar bien con un klinex
15. Acomodar la cubeta dentro del electroporador y verificar que los electrodos queden posicionados adecuadamente.
16. Dar 1 pulso retirar la cubeta dentro del electroporador y colocarla en el hielo
17. Bajo esterilidad agregar 1ml de medio líquido SOC a la celda y homogenizar el cultivo
18. Recuperar el volumen con una pipeta y trasvasarlo en un tubo de vidrio estéril
19. Incubar 1-2h a $30^{\circ}C$ en un tubo
20. Hacer 3 diluciones seriadas y plaquear 100ul del cultivo 10^{-0} y 10^{-3} en una placa LB con el antibiótico de selección.

Nota: Las células control deben plaquearse en LB para verificar la viabilidad de las células competentes y en LB + ATB como control negativo del proceso de transformación.

Protocolo actualizado por Stefany Argueta

12/03/2024

Laboratorio de Ingeniería Genética

Anexo 2. PROTOCOLO DE CO-CULTIVO CON BACTERIAS FLUORESCENTES

1. Extienda 600µl de cultivo bacteriano en placas de agar lipidico. De ocho a diez placas producirán suficientes nematodos para la mayoría de las especies.
2. Incubar en la oscuridad sin humedad a 25°C durante dos días.
3. Agregue 5000 nematodos juveniles infecciosos, u otras etapas dependiendo que se ese utilizando, en 500 µl de medio al césped bacteriano. Incubar las placas a 25°C hasta que se formen los JI.
4. Coloque las placas en trampas White y espere hasta que los nematodos hayan emergido.
5. Los nematodos se pueden almacenar en agua.

Anexo 3. Medio Lipid Agar

Caldo nutritivo	8 gr
Extracto de levadura	5 gr
Cloruro de magnesio	2 gr
Aceite de maíz	4 ml
Jarabe de maíz	7 ml
Agar	15 gr
Agua destilada	890 ml



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

Maestría en Biotecnología

Cuernavaca, Morelos, a 16 de abril del 2026.

VOTOS APROBATORIOS DE TESIS

Los integrantes de la Comisión Revisora de la tesis titulada: Localización de *Serratia marcescens* en el tracto intestinal del nematodo entomopatógeno *Oscheius myriophila*. Que presenta la **C. Yareli Jaime Maldonado**, del Programa de Posgrado Maestría en Biotecnología, bajo la dirección del DR. VÍCTOR MANUEL HERNANDEZ VELAZQUEZ y la codirección de la DRA. MARY CARMEN TORRES QUINTERO, 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 (DIRECTOR DE TESIS, CEIB UAEM)

DRA. MARY CARMEN TORRES QUINTERO (CODIRECTORA DE TESIS, CIB-UAEM)

DR. GUADALUPE PEÑA CHORA (CIB-UAEM)

M. EN C. LAURA PATRICIA LINA GARCÍA (CEIB-UAEM)

DR. ERUBIEL TOLEDO HERNÁNDEZ (UAGRO)





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANO INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

VICTOR MANUEL HERNANDEZ VELAZQUEZ | Fecha:2026-04-16 21:33:20 | FIRMANTE

JJgpt/5laaaQVtMDQO1Kruy0DC6YbQOTCzEdEA79L9GTO22TbaFk+F8v4JS0GIQ1zujw8OvHII3SB2CEHfAG6vm+MOlyiB6G4OUpSy1mqEzS9dRFEbXhkXWLyjKTPDbISMdJO
bxrfji9OfvxtDaofgZ6nvZzRBNOYqzePObNdG05d8GnG3iD0cxc1ANyoL5or9P/i8/DtJDXM0zatzKPAyp6+vadGHOeHlU5negFpZa6c6gtZjFw0d/dGM2WQC3B0hHx+76uG/mAxnf
vcJCbjPJ6rLOi8JG6ulUIAHezh26xfNqbWRjADMaWtjGwydXNPNAS9B16Er1FbnE8hibg==

MARY CARMEN TORRES QUINTERO | Fecha:2026-04-17 09:16:13 | FIRMANTE

XFN6G8K0EnUYGFVliKnam+xAsTpyGCCdt2RdXsifT1YrJCUt98mXwHO9yXOBa4YiQqHOeHPxJxJbfQ5Bcea/T2qg7DcivMB3/SzkBITxprml+LmXfWYfe6ayfgmWeP3hPa7DPH
KbNGMBhC+3+VpAJda9Bz/Zh8ZakVD6PchsqjgmeFvEVi+i0UylXeh6WSBzHRN8t8x6kzLhZBD7Q3CfpsSUmfR2d1DzyJTuwHLjoco2S2rFEbJMOmFH5Z+CyQP6RjUGml7k1nkb
RDGRJ1/iw/+e/flgUMKRYIyCwlCzCcfAlt91qv3HDNeZ2shev5eueldVG7BmMcnzv1q5PUoWQ==

ERUBIEL TOLEDO HERNÁNDEZ | Fecha:2026-04-17 10:50:46 | FIRMANTE

N4hfUzRu079XpJT9f3eKM0/hRma9PnnuPYWig694hTMh8KRk/qFYomh+ssQ4Scs/GpAn2WK/FK/dd/F3ggSdkB5ZvKykEkZnOknNF/Ec+Ub4Y9t+SXcrW18KWvF4dcy32n7jhGvc
Ehe6YIXGGj4VC5VNk3RUwM342LbxfFKfqFPO9pFP8FRKVEDdoXsflFuXRf+wfQS0RI5ta+7oqvYO86TfQPH0NrZrESFWk0KkYvtErUTnWShSsHss4UDsrWUslHcJMu4w6Xt+1LK
DkAxkcf0y8hSYD/dnmvH/mD5lukUR9QODsOxSF2WZTE/t71XHY5z1lkDqciTjt05ftjyGhg==

GUADALUPE PEÑA CHORA | Fecha:2026-04-21 08:36:40 | FIRMANTE

CP1C5pq7yC7/sp12z+RwblXap+jcoUEAxRpWTDYKFJ4hl3MeY1B78DHMLR7IMgTwYsfFqua7PgM5E7rQA8M/W0pcjG04E6pFNYvZ9RRcO5z1cSm0fVF+/U8T6qLxC/rHeAec1
UgRjAdJpw4v2F5FSkmXuYKTSshOvSPruikqt+buXM+rdrvJTTzAZXscTlc5+LM5vTAVeHQRE3ZDKItZnKkzbF6Sf2kDqw3OBqe0dS0ptOwopQA0pbUBTAAi1R0buqVTnCc1zKf
myJmIwb7IVddbwPWj6l/5VZuH89Qf8kSl5pOXWtyWWmbiKiq0hAYz8qqz1fPPPZerILQJ5aAbA==

LAURA PATRICIA LINA GARCIA | Fecha:2026-04-22 22:37:52 | FIRMANTE

VNqngV+1+zcWuBNSaeSxzpliiUswATCWhx02SSLyZOSnfSgVJUJ0HEa6IWueCxm7mioXch2ACobwqM9zu+KuUiTEMJXYL9Ya/wX1f5OPyxa/838UtxcoNobJovfhPcBOeuDF67
V2spwKAoH7Bftq2S4NY3y9YgaDdOpURW5sUDm5nSluEdvgudkcLp5fqD/6wRpuAhjbZOT+20vf5+MlcUQeGZN/k8UixpD+Kr5ch31O+6wHbVsGjAxke0iJ7pkIW2lpZUWEQWUe
B/gA+3gfCmGNZ2tDlkobbNE7vV5G++XLc07BeNiEQsSLVA40i+A+A4RA6NDZXceH7B27Y7YA==

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



xD2yjeJqo

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/zgUx8Eouvpfxv1cb9iThWMLcqX3HXkql>

