



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

Propagación del nemátodo entomopatógeno  
*Caenorhabditis brenneri*

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A:

**IBT. TANIA MAREL GUADARRAMA AVILA**

DIRECTOR:

DR. LUIS CASPETA GUADARRAMA

CO-DIRECTOR:

DR. VÍCTOR MANUEL HERNÁNDEZ VELÁZQUEZ



CUERNAVACA, MORELOS

NOVIEMBRE, 2018

# ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
2.	ANTECEDENTES.....	2
2.1	Nemátodos entomopatógenos.....	2
2.2	Ciclo infeccioso de los nemátodos.....	4
2.3	Mecanismos de asociación entre el NEP y la bacteria.....	6
2.4	Producción de nemátodos juveniles infecciosos.....	9
2.4.1	Producción <i>in vivo</i> .....	9
2.4.2	Producción <i>in vitro</i> en cultivos sólidos.....	10
2.5	Antecedentes directos.....	11
3.	JUSTIFICACIÓN.....	13
4.	HIPÓTESIS.....	14
5.	OBJETIVO GENERAL.....	14
6.	OBJETIVOS PARTICULARES.....	14
7.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
7.1	<i>Galleria mellonella</i> .....	15
7.2	Propagación de los nemátodos <i>in vivo</i> .....	16
7.3	Análisis estadístico.....	18
7.4	Propagación de nemátodos entomopatógenos <i>in vitro</i> .....	18
7.4.1	Medios de cultivo:.....	18
7.5	Producción en matraz:.....	19
7.6	Estudio de infectividad.....	19
7.7	Análisis estadístico.....	20
8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
8.1	Producción de <i>G. mellonella</i> .....	21
8.2	Propagación <i>in vivo</i> .....	21
9.	CONCLUSIÓN.....	31
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	32
11.	ANEXOS.....	39

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía interna de un nemátodo entomopatógeno (Tomada y modificada de Grifaldo, 2010).....	3
Figura 2. Ciclo infeccioso de la dupla nemátodo-insecto. Diagrama de la interacción nemátodo-bacteria. En esta se muestran las etapas de invasión por el nemátodo hasta la muerte de insecto. 1.- Invasión del nemátodo. 2.- Liberación de la bacteria simbiote. 3.- Muerte del hospedero. 4.- Reproducción del NEP. 5.- Alimentación de NEP. 6.- Reproducción de NEP. 7.- Migración de NEP. 8.- Detección de nuevo hospedero. Ver texto para una explicación detallada (Tomada y modificada de Richarson, 1986).....	5
Figura 3. JI producidos en insectos. Aunque es posible producir NEP en sistemas vivos, se busca el establecimiento de sistemas in vitro, que permitan aumentar la producción de forma económica (Peggy Greb, 2006).....	6
Figura 4. Simbiosis bacteria nemátodo y su interacción con el insecto hospedero (modificada de Cabello, 2006).....	9
Figura 5. Larvas pesadas y etiquetadas para su respectiva concentración.....	16
Figura 6. Conteo de NEP obtenidos por larva de <i>Galleria mellonella</i> .....	17
Figura 7. Ingredientes de dieta y condiciones en que se encuentra colonia de <i>G. mellonella</i> . .....	21
Figura 8. Distribución de los pesos de <i>Galleria mellonella</i> . Promedio = 0.333 g. Desviación estándar = 0.021.....	22
Figura 9. Conteo de JI con una concentración inicial de 50 NEP por larva.....	23
Figura 10. Conteo de NEP con una concentración inicial de 100 nemátodos por larva.....	24
Figura 11. Conteo de NEP con una concentración inicial de 150 nemátodos por larva.....	24
Figura 12. Promedio de JI de <i>C. brenneri</i> obtenidos por larva infectada de <i>G. mellonella</i> , con tres concentraciones distintas (50, 100 y 150 JI) cada 48 horas, con su respectiva desviación estándar.....	25
Figura 13. Dieta utilizada para alimentar a larvas de <i>G. mellonella</i> en el laboratorio de Control Biológico.....	29
Figura 14. Matraces de 250 mL con medio descrito por Ehlers y su respectivo inóculo de NEP <i>C. brenneri</i> .....	30

## ÍNDICE DE CUADROS

Tabla 1. Cepas de nemátodos entomopatógenos del cepario del CEIB/UAEM.....	12
Tabla 2. Tasa de producción obtenida al día 13 para las 3 concentraciones de NEP por larva con su respectivo promedio y desviación estándar. ....	27
Tabla 3. Promedios con su respectiva desviación estándar obtenidas con cepas DS, utilizando concentraciones de NEP de 500 y 1000, al día 13.....	28
Tabla 4. Costos y rendimiento final de JI por unidad de producción <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	30

## 1. INTRODUCCIÓN

Si nos enfocamos en las plagas más abundantes en el estado de Morelos, encontraremos que dentro de ellas se encuentran el gusano barrenador del tallo (*Diatraea spp.*) que afecta el 20% de los cultivos de caña de azúcar, el picudo del tronco (*Cholus morio*) que afecta un 10% y la rata de campo (*Sigmoden hispidus*) que afecta también un 10% (Campos *et al.*, 2012). Por ende, son las plagas una de las principales causas de pérdidas en cultivos, y si bien existen actualmente en el mercado varios productos para combatir las plagas del cultivo de la caña de azúcar, la mayoría de estos productos son de origen químico (Ongley, 1997) que han tenido la desventaja, junto con el uso excesivo de otros agroquímicos, que han dejado consecuencias negativas en el ambiente, tales como: contaminación de agua y suelo, impacto en cadenas alimenticias y algunos efectos en la salud humana (Ongley, 1997). Es por eso que continuamente se buscan estrategias que atenúen poblaciones de insectos plaga, como *Diatraea*, sin causar efectos adversos considerables que perjudiquen el ambiente ni la salud humana al mismo tiempo (Hajek, 2004); por tal motivo, el control biológico (CB) es una alternativa adecuada, con buenos resultados contra barrenadores del tallo de la caña de azúcar (Mata, 2014).

Entre las estrategias de CB se encuentra el uso de nemátodos entomopatógenos (NEP) en su fase juvenil infectiva (JI), lo cual ha demostrado ser efectivo para el control de larvas de insectos plaga de la caña de azúcar (i. e., *Otiorhynchus sulcatus* y *Pachnaeus spp*) (Shapiro-Illan y Gaugler, 2002). Es importante enfatizar que su importancia radica, sobre todo, en que son efectivos para combatir plagas con hábitos crípticos, tal como lo es *Diatraea magnifactella* o el picudo, ya que los NEP son capaces de llegar a ellas debido a su capacidad de buscar hospedero, ya que los NEP normalmente pueden permanecer en el suelo durante algunos meses. Sin embargo, una de las limitaciones para el establecimiento de tecnologías de CB es la dificultad para la propagación de los NEP en sistemas de producción in-vitro utilizando biorreactores.

## 2. ANTECEDENTES

Los nemátodos son un grupo altamente diversos ubicado dentro del phylum Nematoda, son gusanos redondos de cuerpo alargado, cilíndrico y no segmentado, para crecer mudan la cutícula en un proceso llamado ecdisis, tienen simetría bilateral, son organismos microscópicos, el tracto alimentario consta de la boca que se conecta con la cavidad bucal o estoma, que se une a su vez al tubo digestivo formado por el esófago, intestino, recto y terminando con el ano (Figura 1); no presentan sistema circulatorio ni respiratorio pero cuentan con un sistema muscular y nervioso (Stock y Goodrich, 2012).

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

### 2.1 Nemátodos entomopatógenos

Los nemátodos son organismos que se presentan en muy diversos hábitats y presentan muchos estilos de vida. Muchas especies están asociadas a invertebrados y la relación puede ir desde fortuita hasta antagonista. El parasitismo es una de las asociaciones que se presenta entre los nemátodos y los insectos, esta asociación puede provocar alteraciones morfológicas, fisiológicas y de comportamiento, hasta la muerte cuando el nemátodo está asociado con una bacteria que mata rápidamente al hospedero, razón por la cual se utiliza el término entomopatógenos para describir a estos nemátodos (Stock y Goodrich, 2012).

Los nemátodos entomopatógenos viven parasitando un amplio rango de insectos de importancia económica en la agricultura (Bathon, 1996). Esta última característica hace que estos organismos sean ideales para el desarrollo de métodos de CB (Picoaga *et al.*, 2007). Los NEP tienen un amplio rango de insectos huésped y son seguros para el ambiente y salud humana por lo que son una herramienta útil en la regulación de poblaciones de insectos plaga (Poinar, 1989; Poinar, 1990; Akhurst, 1990; Boemare *et al.*, 1996).

Las etapas de vida de los NEP son huevo, cuatro estadios juveniles (los estadios I, 2 y 4 viven dentro del hospedero y el estadio 3 o juvenil infectivo [JI] es el único de vida libre) y la etapa adulta; en la Figura 1 se observa un macho y una hembra sexualmente maduros (Picoaga *et al.*, 2007).

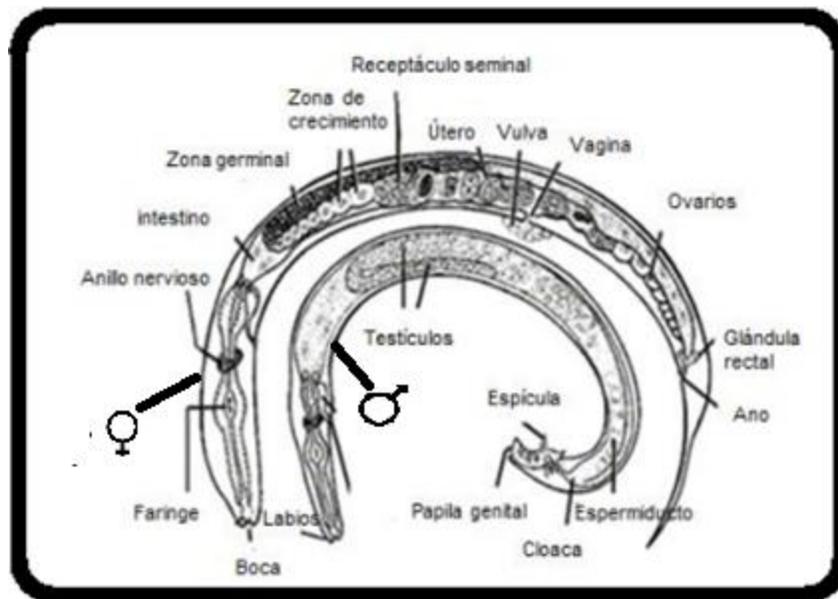


Figura 1. Anatomía interna de un nemátodo entomopatógeno (Tomada y modificada de Grifaldo, 2010).

La manera en que los JI de los NEP entran en contacto con su presa depende de la especie, sus estrategias se dividen en acechadora y cazadora (Gaugler *et al.*, 1989; Campbell y Gaugler, 1993; Lewis *et al.*, 1992, 1993). En la estrategia “acechadora”, el nemátodo simplemente se mantiene estático y espera a que su insecto hospedero este cerca para balancearse sobre él. En la estrategia activa el NEP se comporta como “cazador”; en esta estrategia de búsqueda, el nemátodo se mueve en busca del hospedero respondiendo a las señales químicas del mismo, esto lo logran mediante la detección de productos de excreción como dióxido de carbono, así como los gradientes de temperatura (Gaugler *et al.*, 1980; Georgis, 1992), de pH y algunas moléculas químicas (Pye y Burman, 1981).

Estudios han mostrado que los JI pueden estar en busca de su huésped por periodos de hasta 6 meses sin alimentarse (Ramírez, 1995). En su mayoría, las especies de nemátodos utilizan una estrategia intermediaria para poder alimentarse, lo cual les permite infectar insectos que están generalmente a nivel del suelo, así como los que no lo están (González, 2006).

## 2.2 Ciclo infectivo de los nemátodos

La importancia de los NEP como agentes de control biológico, es que su etapa juvenil 3 (tercer estado larval) se encarga de encontrar al insecto activamente en hábitats, donde otros agentes de control biológico no tienen acceso y, como están asociados simbióticamente a especies de bacterias que producen una mezcla de compuestos tóxicos, no solo matan rápidamente al insecto que hospeda el nemátodo, sino que previenen la colonización del cuerpo por organismos oportunistas; así pues el insecto se puede movilizar fuera del alcance del químico pero no puede hacerlo para escapar del nemátodo (Avilla *et al.*, 2005).

En la Figura 2 se muestra el ciclo infectivo de los NEP. Solo el tercer estado larval modificado, llamado juvenil infectivo (JI) o juvenil “dauer”, es capaz de infectar al hospedero, es la única etapa de vida libre del nemátodo, presenta doble cutícula pues no se desprende de la del segundo estadio después de la ecdisis, lo que le confiere cierta protección. Al entrar en contacto con la larva del insecto, penetra en él por sus orificios naturales (boca, ano y espiráculos), aunque en algunos casos lo hacen también a través de la cutícula perforándola con ayuda de un apéndice en forma de diente ubicado en la parte anterior de su cuerpo. Una vez que el NEP penetró a su hospedero, la bacteria es liberada a través del ano o boca (regurgitando) en la hemolinfa y ésta comienza a degradar los tejidos para obtener nutrientes y poder crecer. La degradación del hospedero también sirve de alimento para el NEP (Picoaga *et al.*, 2007).

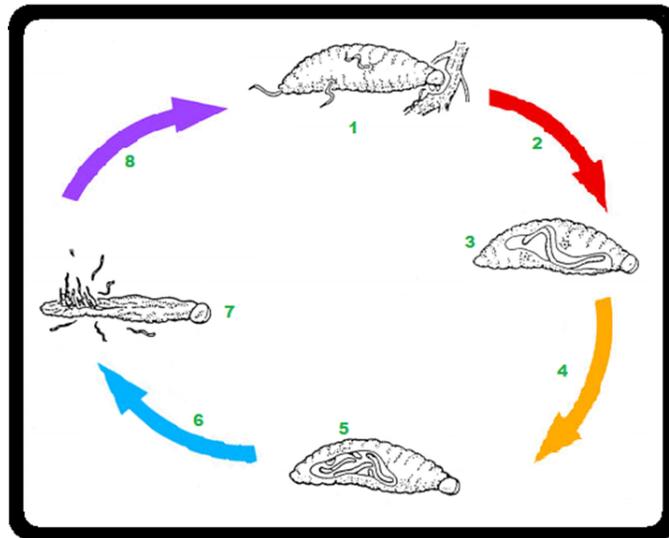


Figura 2. Ciclo infeccioso de la dupla nemátodo-insecto. Diagrama de la interacción nemátodo-bacteria. En esta se muestran las etapas de invasión por el nemátodo hasta la muerte de insecto. 1.- Invasión del nemátodo. 2.- Liberación de la bacteria simbiote. 3.- Muerte del hospedero. 4.- Reproducción del NEP. 5.- Alimentación de NEP. 6.- Reproducción de NEP. 7.- Migración de NEP. 8.- Detección de nuevo hospedero. Ver texto para una explicación detallada (Tomada y modificada de Richarson, 1986).

En condiciones óptimas, las poblaciones de nemátodos juveniles se convierten en adultos, multiplicándose y pasando 2 o 3 generaciones dentro del insecto. Se sabe que la población de nemátodos en una sola larva de insecto es de entre 30 000 y 240 000 individuos (Sáenz, 2005). Cuando los alimentos escasean, la duplicación de la población de nemátodos se interrumpe y los jóvenes infectivos recuperan la bacteria simbiote y abandonan el hospedero (Figura 3). Una vez en el suelo, los nemátodos pueden mantenerse de sus reservas acumuladas, las cuales les sirven para sobrevivir de 4 a 6 meses hasta encontrar un nuevo hospedero (Picoaga *et al.*, 2007). La relación que existe entre el NEP y la bacteria es un claro ejemplo de mutualismo, la bacteria no es capaz de sobrevivir en el suelo, por lo que necesita del JI para permanecer latente en tanto no invada otro hospedero y el nemátodo recibe alimento (Richarson, 1986).



Figura 3. JI producidos en insectos. Aunque es posible producir NEP en sistemas vivos, se busca el establecimiento de sistemas in vitro, que permitan aumentar la producción de forma económica (Peggy Greb, 2006)

### 2.3 Mecanismos de asociación entre el NEP y la bacteria

Las bacterias simbiotas de nemátodos generalmente pertenece a los géneros *Xenorhabdus* o *Photorhabdus* y se asocian con nemátodos de las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae respectivamente, sin embargo, hoy día se conocen otras especies como *Serratia*, que también pueden establecer la asociación mutualista con otros géneros de nemátodos (Picoaga *et al.*, 2007; Ortega *et al.*, 2012). Por ejemplo, en el caso del NEP *Heterorhabditis bacteriophora*, su bacteria simbiota es *Photorhabdus luminescens* (Grijalva, 2014).

Como se mencionó anteriormente, el nemátodo sirve de vector para la bacteria y la deposita en la hemolinfa del insecto cuando lo invade. Las bacterias están presentes en el interior del nemátodo, almacenadas en el tracto intestinal o bien en una vesícula que se encuentra en la parte anterior del intestino del nemátodo, ellas lo acompañan a lo largo de su desarrollo en todo momento, ya que las adquieren desde el momento de su reproducción (González, 2006). Las bacterias contribuyen de forma importante en la virulencia; en cuanto a los nemátodos, se ha reportado que en esta asociación hay algunas especies que tienen poca contribución, aunque también hay reportes para otras especies que se mencionan tienen una contribución importante, ya que también producen una gran variedad de productos que secretan para contrarrestar la actividad antibiótica de la melanina ya que constituye un antibiótico natural que es sintetizado en los sitios de

infección, asimismo el nemátodo puede ayudar a degradar y digerir los tejidos del insecto hospedero (Dillman y Sternberg, 2012).

En el inicio de la infección, la bacteria puede recibir ayuda de los productos de excreción del nemátodo, los cuales reprimen el sistema inmune del insecto, de este modo se inhibe la acción de enzimas antibacterianas, lo que permite la rápida multiplicación de la bacteria simbiote (García, 1994). La bacteria también está adaptada para poder resistir el sistema inmune del insecto hospedero debido a las distintas sustancias que secreta una vez dentro de él (Hadwinger y Loschke, 1981), las cuales son principalmente antibióticos de bajo peso molecular, bacteriocinas y enzimas extracelulares. En la hemolinfa del insecto, la bacteria secreta diversas enzimas que degradan los tejidos del huésped, como lo son algunas proteasas, lipasas y fosfolipasas (Guerra B. *et al.*, 2014) que le permiten a la bacteria proveerse de nutrientes para ella misma, así como también para el nemátodo con el cual se asoció e impiden la colonización de bacterias y hongos oportunistas una vez que el insecto está muerto (Hadwinger y Loschke, 1981).

El nemátodo se encuentra así en condiciones de establecerse en un cultivo casi monoxénico de su bacteria simbiote en el interior del cadáver del insecto. A partir de este momento y a través de la acción de las enzimas liberadas por la bacteria, se produce la destrucción total de las estructuras internas del insecto, lo cual proporciona los nutrientes necesarios para el desarrollo de ambos (García, 1994) de este modo facilita la reproducción del nemátodo, infectando y matando a la larva en un periodo de 48 horas aproximadamente.

Las especies de *Xenorhabdus* son bacterias Gram negativas, móviles, anaerobias facultativas y en forma de varilla (Thomas y Poinar, 1979; Grewal *et al.*, 1999). No se han aislado bacterias de esta especie fuera del hospedero, lo que hace pensar que dependen totalmente del mismo para sobrevivir. Lo que sí se sabe es que el nemátodo no puede establecerse en su hospedero insecto sin la ayuda de la bacteria (González, 2006). Por su parte, las bacterias del género *Photorhabdus* son bacilos Gram negativos. El genoma completo de una cepa bacteriana de este género ya fue secuenciado. La anotación del genoma sugiere que esta contiene genes que codifican toxinas que pueden matar a

*Manduca sexta* (gusano del tabaco) (Blackburn *et al.*, 1998). También encontraron genes que causan apoptosis en los hemocitos del insecto.

La principal diferencia entre ambas bacterias que mutualizan con los NEP son los antibióticos que producen (Forst y Neelson, 1996). Mientras que las bacterias del género *Photorhabdus* producen hidroxistilbinas y antraquinones, las del género *Xenorhabdus* producen antibióticos tales como índoles y xenorhabdinas. Las bacterias de la especie *Photorhabdus* también presentan bioluminiscencia que es una propiedad que permite al organismo portador de enzimas luciferasas emitir luz (Martín *et al.*, 2010)

Las bacterias de los géneros *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* presentan pleomorfismo, lo que significa que *in vitro* presentan formas diferentes de la colonia y variación de fase, la fase 1 (F1) es su forma primaria mientras que la fase 2 (F2) es su forma secundaria, únicamente la llamada fase I es esencial para la actividad entomopatogénica, así como para la reproducción de los nemátodos y la infección del insecto hospedero (Forst *et al.*, 1997).

La bacteria en F1, produce un gran espectro de enzimas degradadoras, agentes antimicrobianos y toxinas, los cuales son responsables de la muerte y degradación del insecto hospedero (Boemare y Akhurst, 1988) con lo cual provee de los nutrientes importantes a los NEP; la F2 puede observarse en cultivos *in vitro*, y su acción en el CB es menor comparada con la F1 (Boemare y Akhurst, 1988). Se sabe que la bacteria simbiote ha podido ser aislada únicamente en F1 directamente de los NEP, y la F2 sólo surge durante la fase estacionaria (Figura 4), es decir, en cultivo *in vitro* (Chavarria- Hernández, 2008).

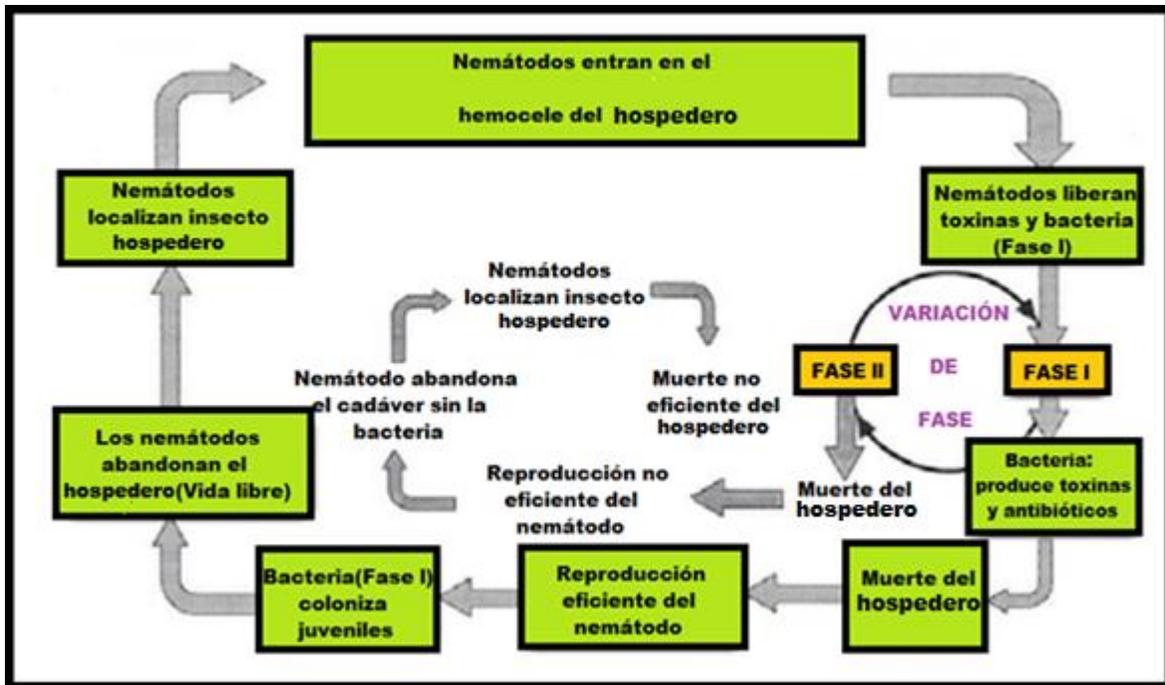


Figura 4. Simbiosis bacteria nemátodo y su interacción con el insecto hospedero (modificada de Cabello, 2006).

## 2.4 Producción de nemátodos juveniles infectivos

El estudio a nivel de campo y el desarrollo de productos comerciales de nemátodos ha sido realizado sólo en las últimas décadas. Para la comercialización de los nemátodos es necesario tener sistemas eficientes y económicos que permitan producir los juveniles infectivos a gran escala y que los simbiosistas mantengan sus cualidades de virulencia, para lo cual se han intentado diferentes sistemas.

### 2.4.1 Producción *in vivo*

Es un proceso simple en el cual se utilizan insectos huésped vivos, teniendo diversas ventajas como: costos bajos para poner en marcha, muy poco uso de tecnología y es uno de los más importantes por el hecho de que se obtienen NEP de alta calidad como resultado del proceso; se utiliza como huésped sustituto por lo regular *Galleria mellonella*, conocida como larva de la polilla de la cera (Shapiro-Ilan *et al.*, 2004), la cual es producida comercialmente en grandes cantidades en varios países, y es susceptible a la mayoría de

especies de nemátodos (Sáenz, 2005). También se utiliza ampliamente como insecto cebo para el aislamiento de hongos (Zimmerman G., 1986; Bedding R. A., Akhurst, R. J. 1975).

La metodología usada en este tipo de producción consta de las etapas de inoculación, cosecha y concentración. Los insectos son inoculados con NEP en bandejas o platos forrados con papel absorbente o filtro, lo cual permite que se lleve a cabo la infección por NEP, posteriormente a los 2-5 días, los insectos que han sido infectados se transfieren a una trampa White (White, 1927), la cual consiste en un recipiente (p. e. una caja Petri) donde se colocan los cadáveres, rodeados de agua contenida en un plato de tamaño mayor. El recipiente central, el cual contiene a los cadáveres, proporciona un sustrato húmedo que permite a los NEP desplazarse, así las generaciones de J1 que se desarrollaron en el interior del cadáver emergen y migran al agua que rodea el mismo, permaneciendo ahí hasta ser cosechados. Este método ha sido reportado por diferentes autores (Dutky et al., 1964; Flanders et al., 1996; Kaya y Stock, 1997; Lindegren et al., 1993; Woodring y Kaya, 1988).

Su gran desventaja es una eficiencia baja ya que este método es ideal si se utiliza para la producción a escala laboratorio, así como también para las pequeñas cooperativas de productores (Gaugler *et al.*, 2000; Gaugler y Han, 2002).

#### 2.4.2 Producción *in vitro* en cultivos sólidos

Para la producción de nemátodos a gran escala y menor costo existen métodos *in vitro* alternativos, como son el medio de cultivo sólido y el medio de cultivo líquido. El método de cultivo sólido ha ido modificándose, en un inicio se utilizaron arenas de dos dimensiones, como cajas Petri con medios de cultivo basados en comida (como riñones de cerdo, alimento para perro y otros productos animales) (Hara *et al.*, 1981), para después utilizarse un medio mejorado que incluía extracto de levadura, caldo nutritivo, aceite vegetal y harina de soja. En la actualidad se ha inventado un sistema de tres dimensiones, que implica el cultivo de nemátodos en espuma de poliuretano (Bedding 1981). En este método de cultivo sólido, un medio líquido es mezclado con la espuma y se esteriliza, las bacterias se inoculan primero, seguidas de los nemátodos después de tres días. Posterior a esto, pueden ser cosechados después de 2 a 5 semanas mediante la colocación de la espuma sobre

tamices que se sumergen en agua, para que de este modo los JI migren fuera de la espuma y posteriormente se sedimenten, se pasan a un tanque de recolección en el cual se limpia el producto lavándolo con agua varias veces (sedimentación y decantación) (Bedding 1981 y 1984).

## 2.5 Antecedentes directos

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

El laboratorio de Control biológico del Centro de Investigación en Biotecnología de la UAEM cuenta con tres cepas de NEP: DS, MC2 y MC5. Las cepas MC5 y MC2 fueron aisladas del suelo de la localidad de Tepalcingo, la cepa DS se aisló directamente de una larva muerta de *D. magnifactella* en campo (Castro, 2015) (Tabla 1). Estas especies se identificaron previamente realizando técnicas morfométricas, morfológicas y moleculares (Castro, 2015). De la cepa DS se obtuvo una secuencia de 1637 nucleótidos, de la cual el 99% tuvo identidad con *Caenorhabditis brenneri* (Castro, 2015), al ser esta cepa la única aislada directamente del insecto plaga fue elegida para llevar a cabo el presente proyecto.

Tabla 1. Cepas de nemátodos entomopatógenos del cepario del CEIB/UAEM

Cepa	Especie	Aislamiento
MC5	<i>Oscheius myriophila</i>	Suelo
MC2	<i>Heterorhabditoides chongmingensis</i>	Suelo
DS	<i>Caenorhabditis brenneri</i>	Larva de <i>D. magnifactella</i>

En este trabajo abordaremos estrategias de cultivo *in vivo* utilizando larvas de *Galleria mellonella*, e *in vitro*, en matraces, por lo que el principal objetivo es desarrollar tecnología para la producción de NEP aislados en el estado de Morelos, y la evaluación de su infectividad sobre el gusano barrenador del tallo de caña de azúcar *Diatraea magnifactella*, y de los antecedentes anteriores se pudo derivar la siguiente justificación para realizar el presente proyecto.

### 3. JUSTIFICACIÓN

El cultivo de caña de azúcar es uno de los más importantes, tanto a nivel mundial como en México, y en el estado de Morelos representa una de las actividades económicas más importantes para su población; es por esto que las pérdidas de cultivos ocasionadas por plagas y enfermedades son un problema con un impacto relevante, y aunque existen diversas plagas, es *Diatraea magnifactella* la de mayor importancia en Morelos ya que se trata de un gusano barrenador del tallo que provoca daños severos, dando como resultado pérdidas en los cultivos. No obstante, el uso de plaguicidas químicos para su control no ha sido eficiente, tienen el inconveniente de generar resistencia, provocan daños ambientales, así como poseer un limitado alcance.

Entre los diferentes métodos de control microbiano, el empleo de NEP es una buena alternativa. *Caenorhabditis brenneri* (cepa DS) es la primera especie reportada en México como nemátodo entomopatógeno aislado directamente de una larva del barrenador *D. magnifactella* en campo, es por esto que se busca hacer más eficiente su reproducción masiva para más adelante realizar estudios en campo con este NEP. El desarrollo de la tecnología para su producción y la implementación de su uso en el campo se han visto limitados debido a las dificultades en su propagación, y según reportes la cantidad de NEP que se necesitan por hectárea es de  $2.5 \times 10^9$  JI, es por eso que su propagación masiva es de suma importancia. En este trabajo se desarrollarán nuevas estrategias que permitan obtener nemátodos entomopatógenos en altas cantidades y de esta forma puedan utilizarse como alternativa en el control de plagas.

#### 4. HIPÓTESIS

El nemátodo entomopatógeno *Caenorhabditis brenneri* (cepa DS) se reproducirá *in vivo* en larvas de *Galleria mellonella* e *in vitro*, obteniendo cantidades similares a cepas comerciales de nemátodos entomopatógenos.

#### 5. OBJETIVO GENERAL

Reproducir el nemátodo entomopatógeno *C. brenneri* (cepa DS) en larvas de *G. mellonella* y en cultivos controlados en matraces agitados, así como comparar los costos entre ambos métodos.

#### 6. OBJETIVOS PARTICULARES

- Reproducir a *C. brenneri* (cepa DS) sobre larvas de *G. mellonella*.
- Estimar la dosis óptima de inoculación inicial para la producción *in vivo*.
- Reproducir a *C. brenneri* (cepa DS) utilizando matraces agitados.
- Estimar el costo de la producción de *G. mellonella*.
- Comparar los métodos de producción (*in vivo* y matraces agitados).
- Evaluar un medio reportado para la producción *in vitro* para *C. brenneri* (cepa DS).

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), en los laboratorios de Control Biológico y de Biología de Sistemas del Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB), ubicados en campus Chamilpa.

Los NEP de la cepa *DS* fueron aislados con anterioridad, directamente de una larva de *Diatraea magnifactella* tomada del interior del tallo de caña de azúcar, y se mantuvieron en suspensiones acuosas en frascos de cultivo Corning a una temperatura de  $12 \pm 1^\circ\text{C}$ .

### 7.1 *Galleria mellonella*

Con el fin de contar en todo momento con el material necesario, se mantiene en el laboratorio de Control Biológico la cría de *Galleria mellonella*, la cual se mantiene en botes de plástico de capacidad de 1 litro, aunque también se utilizan recipientes de plástico adaptados especialmente para las larvas, esto se realizó añadiendo una malla de fibra de vidrio a la tapa del recipiente, y se conservaron en una incubadora, a aproximadamente  $28^\circ\text{C}$ . Para su cuidado, es importante alimentarlos con una dieta especial, que consiste en:

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

Procedimiento:

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

## 7.2 Propagación de los nemátodos *in vivo*

Se utilizaron larvas de *G. mellonella* de sexto y séptimo instar, las cuales fueron utilizadas para la propagación de nemátodos entomopatógenos. Éstas fueron pesadas para comprobar que su peso fuera similar. Se colocó un disco de papel filtro de poro mediano en el fondo de cajas Petri (90x15 mm). Posteriormente se colocaron una larva por caja y se infectaron con 50, 100 o 150 JI provenientes de una suspensión de NEP. Se utilizaron 10 larvas por cada tratamiento.

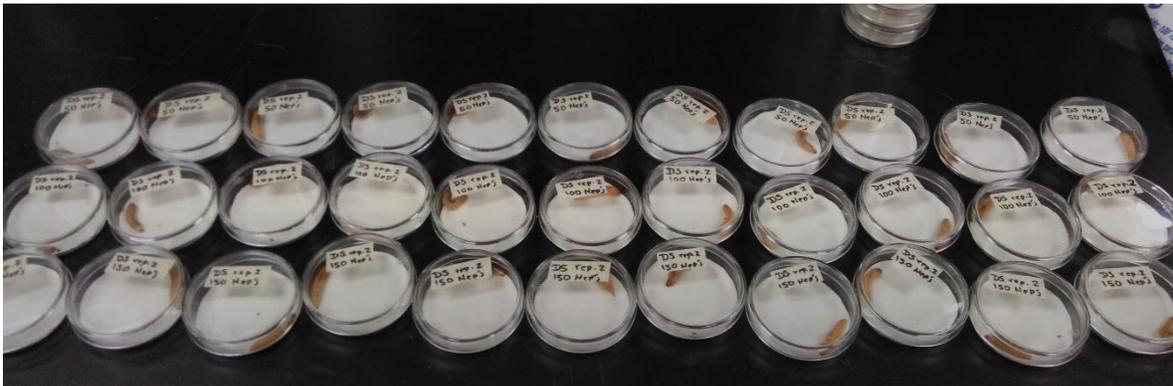


Figura 5. Larvas pesadas y etiquetadas para su respectiva concentración.

El método propuesto por Woodring y Kaya (1988) se utilizó para llevar a cabo la cuantificación de juveniles infectivos. Para lo cual se homogenizó la suspensión inicial con NEP contenida en frascos Corning, de esta suspensión se tomaron 100  $\mu$ l los cuales se depositaron en una caja Petri. Posteriormente se realizó el conteo de juveniles infectivos vivos utilizando un microscopio estereoscópico. Esto se repitió cinco veces y se calculó el promedio de los conteos para así saber la concentración de la suspensión de nemátodos. Posteriormente se utilizó la siguiente fórmula para realizar las diluciones que se utilizaron en las siguientes etapas:

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

Dónde:

A = Mililitros de la suspensión con concentración conocida y de la suspensión a diluirse.

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

C = Volumen final en mililitros de la nueva dilución.

D = Concentración deseada en la nueva dilución.

C - A = Mililitros de agua a ser agregados para hacer la nueva dilución.

Se realizó un conteo de NEP cada 48 horas durante 20 días a partir de que la larva infectada murió.

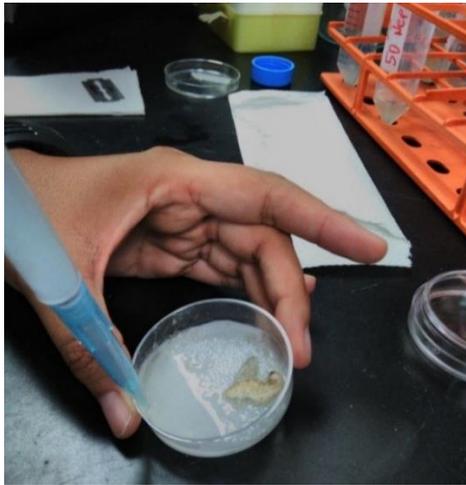


Figura 6. Conteo de NEP obtenidos por larva de *Galleria mellonella*.

Se realizaron además bioensayos utilizando concentraciones de NEP iniciales de 500 y 1000 utilizando a *C. brenneri* (Cepa DS) y realizando conteo de NEP a los 13 días. Para esto se realizó inicialmente un pesaje de las larvas de *G. mellonella*, oscilando los pesos de igual forma entre 0.30 y 0.37 gramos, posteriormente se depositaron en cajas Petri con papel filtro en el fondo, para después realizar el conteo de NEP producidos con ayuda del estereoscopio.

### 7.3 Análisis estadístico

Para la evaluación de cada estudio se utilizó como herramienta estadística un diseño completamente al azar, (análisis de varianza) la prueba de Tukey, para lo cual se empleó el programa SAS.

### 7.4 Propagación de nemátodos entomopatógenos *in vitro*

#### 7.4.1 Medios de cultivo:

##### **Medio LB (g/L):**

- Cloruro de sodio 5.0
- Extracto de levadura 5.0
- Peptona de caseína 10.0 (pH 7.2 ± 0.2).

##### **Cultivo monoxénico descrito por Ehlers pH 7.5 (g/100 mL):**

- Peptona B. 1.0
- Extracto de levadura 1.0
- Yema de huevo deshidratada 0.6
- Harina de soya 0.3
- Cloruro de sodio (NaCl) 0.4
- Cloruro de potasio (KCl) 0.035
- Cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>) 0.03
- Sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>) 0.02
- Sulfato Ferroso (FeSO<sub>4</sub>) 0.005
- Aceite vegetal de maíz 3.0

(Udo-Ehlers, 2001).

Para la obtención de un cultivo monoxénico *in vitro*, las bacterias simbiotas se deben aislar de cadáveres recién infectados, para posteriormente contar con NEP axénicos y de este

modo introducirlos posteriormente a un cultivo de bacterias puras. Para lo cual, se utilizó cloro al 5% antes de agregarlos al cultivo bacteriano:

- Se centrifugaron en tubos Falcon de 50 mL a 2000 rpm durante 5 minutos, posteriormente se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril.
- Las bacterias simbiontes estuvieron previamente almacenadas en viales de 2 mL en 25% p/v glicerol y se dejaron crecer en caldo LB durante 48 horas antes de agregar los NEP previamente desinfectados con su correspondiente medio de cultivo (cultivo monoxénico descrito por Ehlers) a 30° C y 150 rpm (Chavarría, 2010).

#### 7.5 Producción en matraz:

- Se utilizaron matraces de 250 mL, y se realizarán 3 repeticiones utilizando 8 matraces en cada una de ellas, realizando un conteo de NEP producidos, cada 48 horas.
- Se utilizó un vial de bacteria por cada matraz (1 mL por cada 100 mL de medio LB), agregando los NEP junto con su respectivo medio después de 48 horas de la inoculación de la misma en medio LB (150 NEP/mL).
- Posteriormente se agregaron 40 mL de medio LB con la respectiva bacteria, y a las 48 horas se agregaron también 40 mL de medio de cultivo monoxénico descrito por Ehlers) con el inóculo correspondiente de NEP, que será de 150 por mL.
- Se tomaron muestras y se realizaron conteos durante 16 días cada 48 horas.
- Para finalizar, se realizará el correspondiente análisis estadístico.

#### 7.6 Estudio de infectividad

Se utilizaron larvas de *G. mellonella* de 5° instar para determinar la capacidad infectiva de los Juveniles Infectivos (JI) resultantes de la producción *in vivo* y de este modo comprobar que los NEP siguen cumpliendo su función infectiva. Para esto, en el fondo de cajas Petri de 90X15 mm se colocó un disco de papel filtro de poro mediano, posteriormente se colocó una larva por caja y se añadieron NEP a la larva de *G. mellonella* (200 µL). Las cajas con las larvas y los NEP se dejaron una semana a temperatura ambiente, para posteriormente verificar que siguieran logrando infectar con normalidad a las larvas.

## 7.7 Análisis estadístico

Para la evaluación de cada estudio se utilizará como herramienta estadística un diseño completamente al azar, (análisis de varianza) la prueba de Tukey, para lo cual se empleará el programa SAS.

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1 Producción de *G. mellonella*

Con el propósito de contar en todo momento con el material biológico con el cual se lleva a cabo la propagación de los NEP *in vivo*, se cuenta con una colonia establecida de *G. mellonella* en el laboratorio de Control Biológico para la cual se utiliza una dieta especial, la cual se compone de miel de abeja, glicerol, salvado de trigo (estéril), cereal de arroz y levadura. Colocándose tanto en botes de 1 L, así como en recipientes a los que se les colocó una malla de fibra de vidrio, en los cuales se lleva a cabo su ciclo de vida.

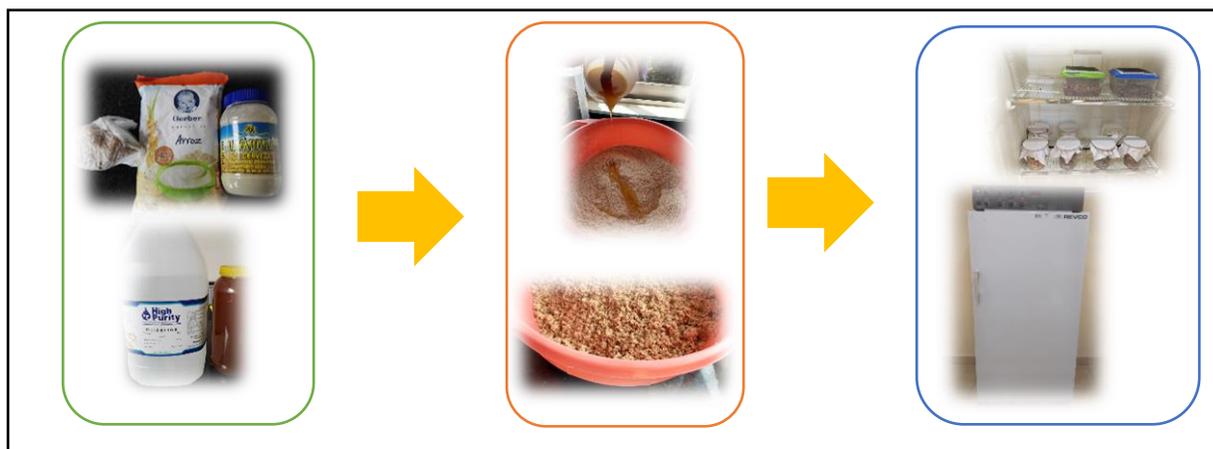


Figura 7. Ingredientes de dieta y condiciones en que se encuentra colonia de *G. mellonella*.

### 8.2 Propagación *in vivo*

Para la propagación *in vivo* de los NEP se utilizaron larvas de *G. mellonella* de quinto instar tomadas de la colonia, las cuales fueron previamente pesadas. El peso de estas larvas osciló entre los 0.30 y los 0.37 gramos como se puede apreciar en la siguiente figura (Figura 8).

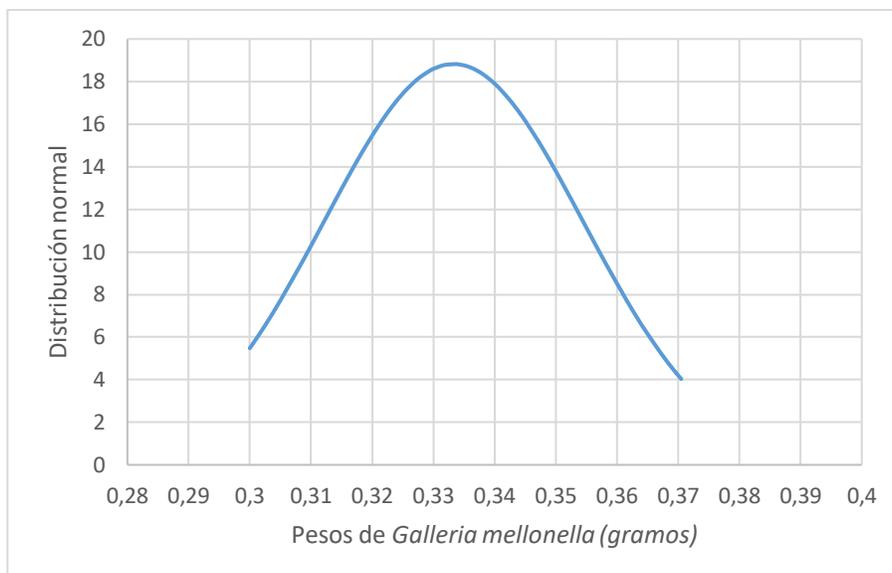


Figura 8. Distribución de los pesos de *Galleria mellonella*. Promedio = 0.333 g. Desviación estándar = 0.021.

Se evaluaron tres concentraciones de inoculación de 50, 100 y 150 JI de *C. breunneri* por larva de *G. mellonella* de 5° instar, y se evaluó la producción de JI a partir del día 5 de la inoculación, posteriormente se disectaron las larvas para realizar el conteo de los JI cada 48 horas durante 20 días.

Podemos observar en la gráfica de la figura 8 que los pesos de las larvas utilizadas fueron similares, esto se hizo con el fin de disminuir factores que afecten el rendimiento final en la comparación de las diferentes concentraciones de NEP utilizados para la propagación *in vivo*.

Para la producción de NEP en larvas, los resultados obtenidos muestran que la mayor cantidad de NEP se obtuvo a los 13 días posteriores a la inoculación con JI a distintas concentraciones siendo en promedio de 12 a 15 días lo reportado en cuanto a días de cosecha de NEP, de igual forma la cantidad obtenida fue la esperada al compararla con trabajos anteriores realizados con esta cepa, siendo de aproximadamente 15, 000 NEP por larva de *G. mellonella* para una concentración inicial de 50 NEP de la cepa DS (Cruz, 2015).

Se realizó una prueba de Tukey en el programa SAS y se obtuvo su correspondiente ANOVA.

Se realizó el conteo una vez que la larva infectada murió, tomando una larva de cada concentración cada 48 horas, siendo en total 20 días los que se realizó (Figura 9, 10 y 11).

Las larvas fueron disectadas para posteriormente realizar el conteo de nemátodos.

Los resultados observados en la figura 9, en la cual se utilizó una concentración inicial de 50 NEP por larva de *G. mellonella*, fue que en el día 13 se obtuvo la mayor cantidad de NEP, siendo de 14, 434 NEP. Si bien se puede observar un incremento en el día 19, puede observarse que el trayecto de la gráfica se mantiene alrededor de los 15, 000 NEP.

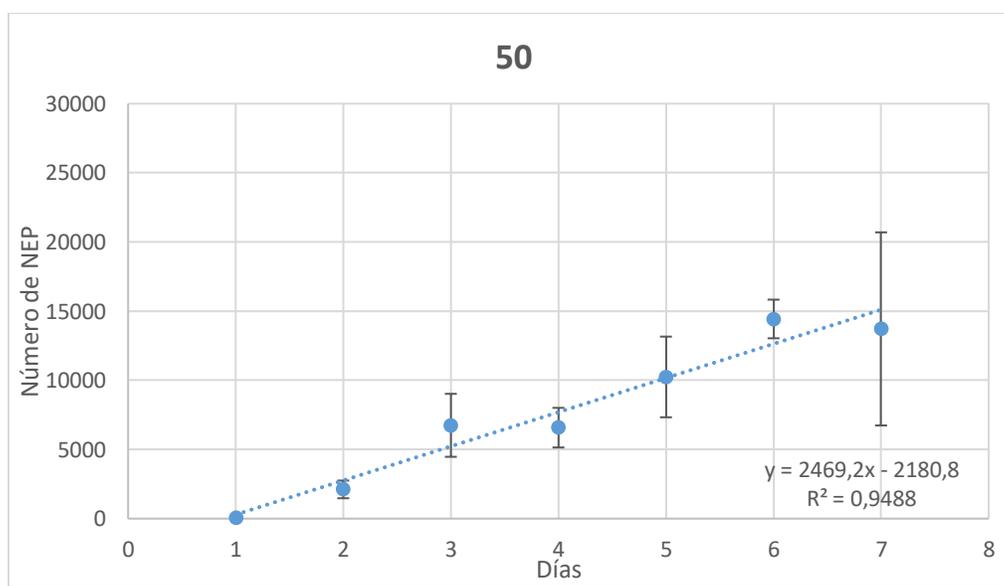


Figura 9. Conteo de JI con una concentración inicial de 50 NEP por larva.

A la concentración de 100 NEP, el comportamiento es similar, para el día 13 se obtuvo una producción de 14, 298 NEP aunque al día 15 hay un aparente incremento, el día 17 y 21 se observó un ligero descenso en la producción (Fig 10).

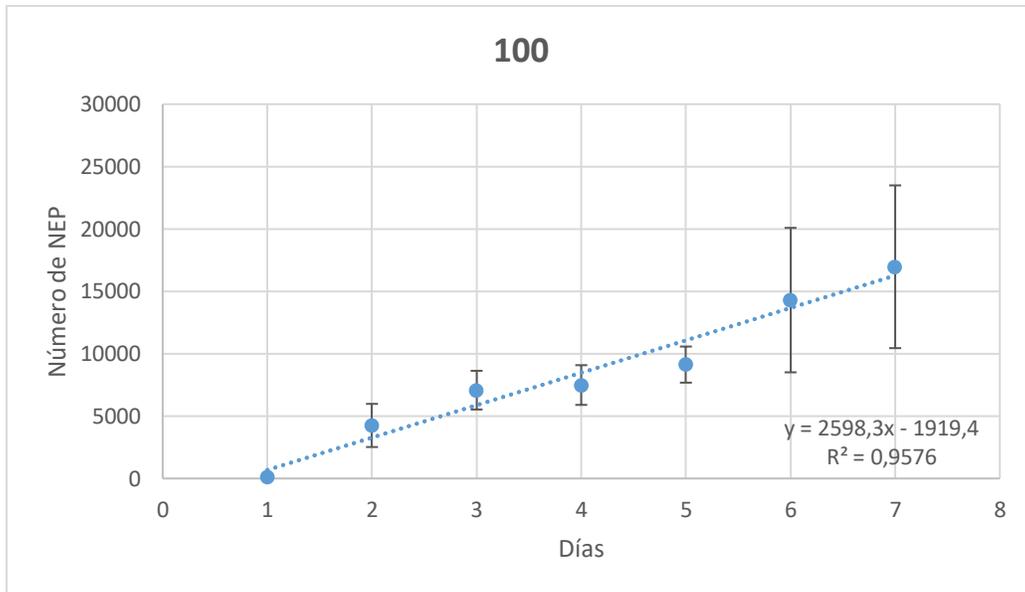


Figura 10. Conteo de NEP con una concentración inicial de 100 nemátodos por larva.

Por último, en la figura 11, podemos observar que en el caso de las larvas inoculadas con 150 NEP iniciales, al igual que en las concentraciones anteriores el día con mayor producción fue el 13, sin embargo, la cantidad alcanzada fue de 18, 084 NEP, alcanzándose otro pico el día 21 con 19, 560 NEP.

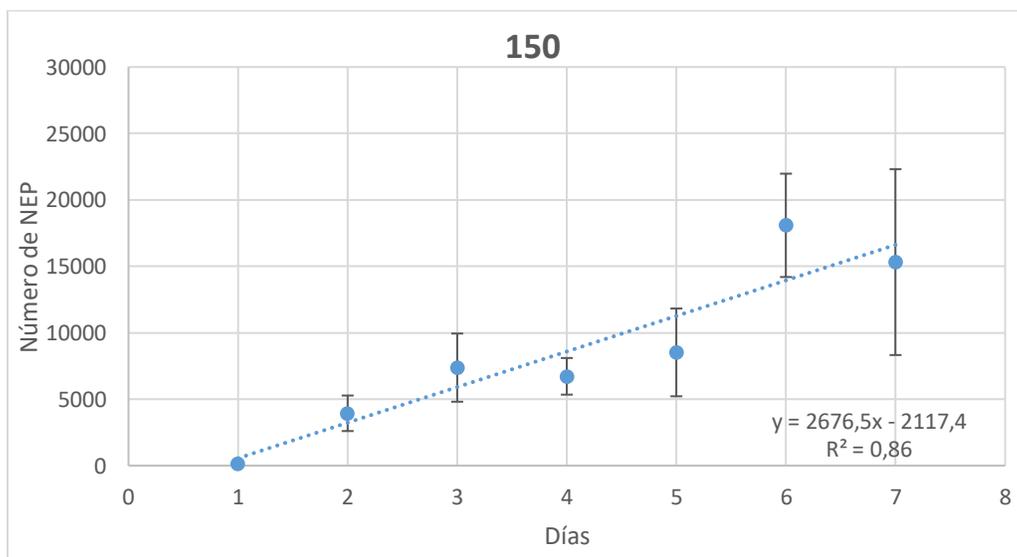


Figura 11. Conteo de NEP con una concentración inicial de 150 nemátodos por larva.

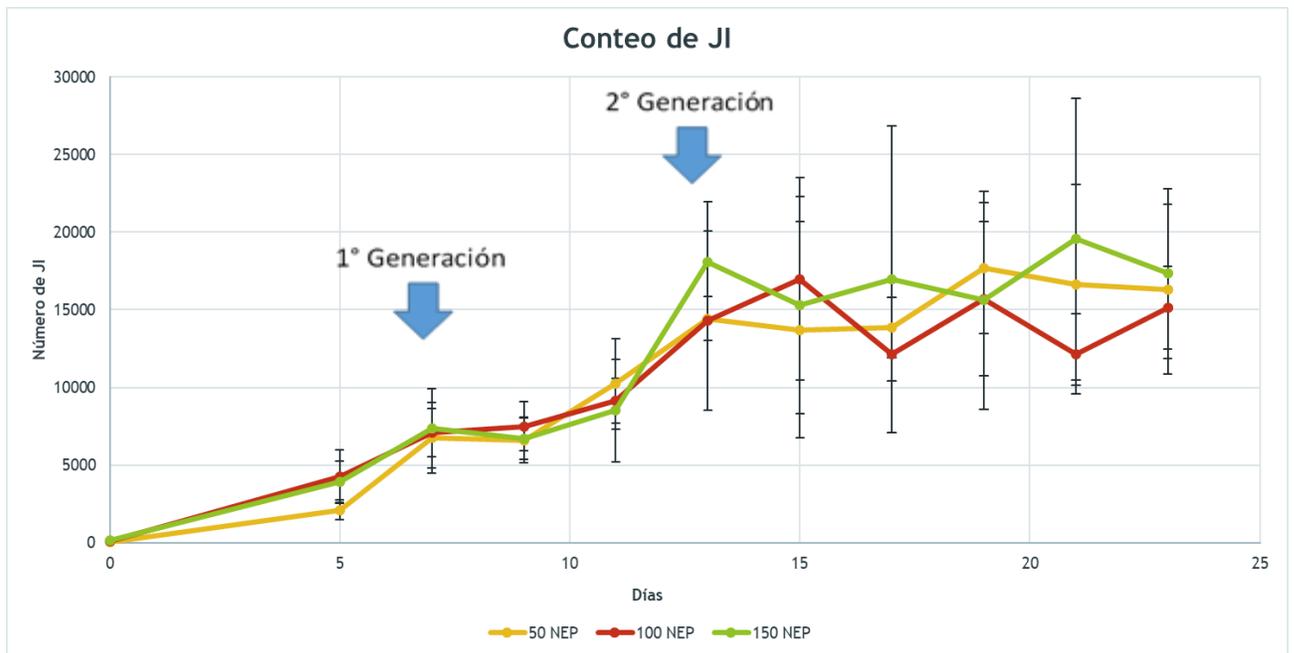


Figura 12. Promedio de JI de *C. brenneri* obtenidos por larva infectada de *G. mellonella*, con tres concentraciones distintas (50, 100 y 150 JI) cada 48 horas, con su respectiva desviación estándar.

Los anteriores resultados concuerdan con el promedio reportado de 12 a 15 días en cuanto a días de cosecha de NEP, de igual forma la cantidad obtenida para ese día fue la esperada al compararla con trabajos anteriores realizados con esta cepa, siendo de 14, 697 NEP por larva de *G. mellonella* para una concentración inicial de 50 NEP de la cepa DS (Cruz, 2015).

Se realizó el conteo una vez que la larva infectada murió, tomando una larva de cada concentración cada 48 horas, siendo en total 20 días los que se realizó (Figura 9, 10 y 11).

Las larvas fueron disectadas para posteriormente realizar el conteo de nemátodos.

Comparando las 3 concentraciones iniciales utilizadas por larva de *G. mellonella*, se observó que tuvieron un comportamiento similar entre sí, siendo el día 13 en el cual el incremento fue el mayor. Algo que se puede agregar a esta comparación, es que en la Figura 12, puede observarse un aumento en la producción en los días 7 y 13, en cada una de las concentraciones coincidiendo en este punto, se puede inferir entonces, que en esos dos días se producen 2 generaciones de NEP por larva de *G. mellonella*, lo cual coincide con lo

reportado en la literatura con otras especies de NEP pertenecientes a *Steinernema* y *Heterorhabditis* (Sáenz, 2005). A pesar de esto, al comparar estos resultados con otros reportados, se observó una diferencia importante, ya que se ha encontrado en la literatura que utilizando *Steinernema carpocapsae* en larvas de quinto instar de *G. mellonella*, se han reportado producciones de  $5 \times 10^6$  JI por larva a partir de un inóculo de 50 NEP, 7 días después de la infección manteniendo las larvas una temperatura de 25 °C (Lindegren *et al.*, 1993). Ortiz y colaboradores afirman que la producción de NEP es muy variable. En el 2007, Realpe y colaboradores reportaron una producción en larvas de *G. mellonella* de quinto estadio de 82, 729 JI por larva, y de 63, 683 JI por larva por NEP *Steinernema colombiense* y *Heterorhabditis bacteriophora* respectivamente, utilizando un inóculo de 1000 JI, después de 7 días de la infección a una temperatura de 25 °C.

Las variaciones observadas pueden ser resultado de diversos factores en conjunto, como pueden ser la temperatura, tamaño de hospedero utilizado, así como la capacidad que los nemátodos mismos puedan tener para suplir los requerimientos que necesitan en su dieta (Sáenz y Olivares, 2008), asimismo la especie de nemátodo (Boff *et al.*, 2000; Shapiro-Ilan *et al.*, 2002), tiempo de emergencia y la duración del ciclo en el hospedante (Grewal y Georgis, 1998), otros factores más a considerar son la humedad y aireación, como ya se dijo los factores ambientales son importantes (Burman y Pye, 1980; Friedman, 1990).

Los resultados arrojaron, que las cifras obtenidas de las 3 repeticiones realizadas no tienen diferencias significativas entre sí, a pesar de iniciar con concentraciones distintas. Lo cual coincide con los análisis de Shapiro-Ilan y colaboradores en el 2002, en los cuales se reportó que no existió un efecto entre las concentraciones de NEP inoculadas para producción, obteniendo resultados de 145 410, 184 746, 249 117 y 220 748 JI por larva, esto a partir de diferentes concentraciones, que fueron 1000, 4000, 8000 y 12000 NEP sobre larvas de *G. mellonella* de quinto instar.

Es por eso que se decidió realizar un análisis de la tasa de producción utilizando la siguiente fórmula:

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

En dónde:

Rf = Índice o tasa de producción.

Pf = Población final (Promedio de JI producidos)

Pi = Población inicial

Se obtuvo la siguiente tabla:

Tabla 2. Tasa de producción obtenida al día 13 para las 3 concentraciones de NEP por larva con su respectivo promedio y desviación estándar.

Repetición	[50]	[100]	[150]
1	253.26	61.8	91.42
2	291.2	192.75	154.4
3	321.6	174.4	115.86
<b>PROMEDIO</b>	288.68 ± 27.95 a	142.98 ± 57.89 b	120.56 ± 25.92 b

Letras iguales no presentan diferencias estadísticamente significativas. P > 0.05

Los resultados en tasa de producción con su promedio, desviación estándar y resultado de la prueba de Tukey (Tabla 2), muestran que la tasa es mayor con la concentración inicial de 50 NEP, siendo la única concentración en la cual se presenta una diferencia estadísticamente significativa.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Cruz en el 2015, ya que obtuvo una tasa de producción mayor con su inóculo de menor concentración inicial (10 NEP por larva), obteniendo una tasa de 478.48, 349.95 y 300.44 en cada concentración utilizada (10, 30 y 50 JI/larva).

Se piensa que los resultados obtenidos se explican debido a que entre menor número de individuos haya en la larva, mayor será su reserva de alimento, y por ende habrá más generaciones de NEP que puedan desarrollarse dentro de la misma (Woodring y Kaya, 1988), de modo contrario al realizar un inóculo de mayor concentración se obtienen menos ciclos dentro del hospedero. Lo explicado con anterioridad resulta benéfico cuando se trata de producirlos, ya que aun cuando el gasto inicial es menor, la producción final es la esperada o incluso mejor.

Los resultados obtenidos con las concentraciones de 500 y 1000 NEP (Tabla 3), nos dieron como resultado producciones de 6867 y 7238 NEP respectivamente, las cuales no tuvieron diferencias significativas al ser analizadas con el paquete estadístico SAS.

Tabla 3. Promedios con su respectiva desviación estándar obtenidas con cepas DS, utilizando concentraciones de NEP de 500 y 1000, al día 13.

Cepa	[500] NEP	[1000] NEP
	DÍA 13	DÍA 13
DS	6867 ± 660 a	7283 ± 758 a

Letras iguales no presentan diferencias estadísticamente significativas.  $P > 0.05$

Con la información obtenida, se espera encontrar un método de producción que nos dé como resultado una mayor cantidad de NEP, para de este modo en un futuro realizar pruebas en campo con la especie utilizada en el presente trabajo, debido a que, al hacer el cálculo de la cantidad de NEP que se necesitan en campo por hectárea ( $2.5 \times 10^9$  JI/ha) y con los resultados obtenidos en esta parte del proyecto, se necesitarían de aproximadamente 166 666 larvas de *G. mellonella* para llegar a la cantidad requerida para aplicación, por lo tanto se espera mejorar el número obtenido con la propagación en matraces, y asimismo avanzar en la investigación de los posibles parámetros requeridos, si se desea avanzar a la propagación en biorreactor en un futuro.

Algo más que agregar son los costos que se calcularon de acuerdo a los ingredientes utilizados en el laboratorio de C. B. del CEIB, dando como resultado que cada larva de *G. mellonella* requiere de un costo aproximado de \$0.56, si bien, el costo es menor comparado con otros trabajos, en los cuales calcularon cantidades mayores, siendo de \$4.67, al momento de necesitar de una cantidad elevada, el costo sería muy alto en ambos casos, por ende, se siguen buscando alternativas de propagación, que disminuyan costos y puedan ser igualmente efectivas para uso en el C. B.



Figura 13. Dieta utilizada para alimentar a larvas de *G. mellonella* en el laboratorio de Control Biológico.

A continuación, se muestra una tabla (tabla 4) con los costos de *G. mellonella* en el laboratorio como unidad de producción, y para el medio de cultivo descrito por Ehlers (15 mL), además del costo generado por larva en el laboratorio de Control Biológico, haciendo una comparación entre sí, si bien el rendimiento final reportado en la tabla por Ehlers en 2014 es distinto al rendimiento reportado por nuestra especie de NEP *C. breneri*, al hacer una comparación entre larva y medio de cultivo, la diferencia difiere bastante en lo reportado, por tal motivo, se intentó realizar esto en el laboratorio, esperando que esto se repitiera con la especie de NEP utilizada en el presente trabajo.

Tabla 4.- Costos y rendimiento final de JI por unidad de producción *in vivo* e *in vitro*.

Método	Medio de producción	Unidad de producción	\$/Unidad de producción	Rendimiento final (NEP)
<i>In vitro</i>	Medio de crecimiento	15 mL de medio descrito por Ehlers	1.8	1,968,000
<i>In vivo</i>	Insecto hospedero	1 larva de <i>G. mellonella</i>	5.06	200,000
	Insecto hospedero	1 larva de <i>G. mellonella</i> del CEIB	0.56	15,000

Los resultados obtenidos en la parte experimental utilizando matraces, no fueron los esperados, ya que la cantidad de nemátodos agregados al medio de cultivo no sobrevivieron a pesar de utilizar un medio de crecimiento previamente utilizado con otras especies de NEP, por lo cual se buscarán alternativas para una adecuada producción *in vivo*, entre las cuales podrían añadirse cambios en algunos reactivos utilizados, o incluso modificar ciertas condiciones como temperatura, además podría utilizarse algún medio alternativo para observar el comportamiento de la cepa Ds.



Figura 14. Matraces de 250 mL con medio descrito por Ehlers y su respectivo inóculo de NEP *C. brenneri*.

## 9. CONCLUSIÓN

- La producción *in vivo* de *C. brenneri* en larvas de *G. mellonella* a una concentración de 50 NEP cuenta con una mayor tasa de producción a diferencia de las concentraciones de 100 y 150 NEP, además de obtener cantidades de JI sin diferencias significativas entre sí.
- Se produjeron aparentemente 2 generaciones de NEP en la propagación *in vivo* en larvas de *G. mellonella* en 13 días.
- Se obtuvo un promedio de 14 434 NEP por larva de *G. mellonella*, es decir, una cantidad de aproximadamente 43, 345 NEP por gramo de larva.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

Avilla J., Caballero P. y Jacas J., (2005). El control Biológico de plagas y enfermedades. Universitat Jaume I. Castellon de la Plana. 223 pp.

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

Bedding R. A., Akhurst R. J., (1975). A simple technique for the detection of insect parasitic *rhabditid* nematodes in soil. *Nematologica*: 21, 109–110.

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

Bedding R. A., (1984). Large scale production, storage, and transport of the insect - parasitic nematode *Neoaplectana* spp. and *Heterorhabditis* spp. *Annals Applied Biology*, 104: 117–120.

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

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

Boemare, N. E. y Akhurst R. J., (1988). "Biochemical and Physiological Characterization of Colony Form Variants in *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae). " *Journal of General Microbiology*, Australia, 134: p. 751-761.

Boemare, N., Laumond, C., y Mauleon, H., (1996). El complejo entomopatógono nematodo-bacteria: biología, ciclo de vida y seguridad de los vertebrados. *Biocontrol Science and Technology*, 6 (3), 333-346.

Burman M. y Pye A. E., (1980). *Neoaplectana carpocapsae*: respiration of infective juveniles. *Nematologica*, 26: 214 - 219.

Cabello T., (2006). Control biológico, Entomopatógenos y sus características. 26 enero 2017, de UAL Sitio web: <http://www.ual.es/personal/tcabello/Temarios/CBTema06Web.pdf>

Campbell, JF, y Gaugler, R., (1993). Comportamiento de nictación y sus implicaciones ecológicas en las estrategias de búsqueda de huéspedes de nematodos entomopatógenos (Heterorhabditidae y Steinernematidae). *Comportamiento*, 126 (3), 155-169.

Campos Hernández, A., Cruz Cruz, E., y Canul Ku, J., (2012). Tecnología para el manejo y control de plagas y enfermedades en Caña de Azúcar en el Estado de Morelos.

Castro, O. I. R., (2015). Nemátodos entomopatógenos en cultivos de caña de azúcar del estado de Morelos.

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

Chavarría H., (2008). Efecto del medio de cultivo sobre la cinética de producción de fases infectivas juveniles del nematodo entomopatógeno *Steinernema carpocapsae*, en cultivo monoxénico sumergido., *Revista mexicana de ingeniería química.*, vol.7 no.1 abr. 2008. p. 13-18.

Cruz K., (2015). Evaluación de producción *in vivo* de tres cepas de nemátodos entomopatógenos aislados en Morelos.

Diario de Morelos., (2012). Caña de azúcar. Página web: <http://www.diariodemorelos.com/blog/ca%C3%B1a-de-az%C3%BAcar>.

Dillman, A. R. y Sternberg, P. W., (2012). Nemátodos entomopatógenos *Current Biology*. 22 (11), R430-R431.

Dutky, S. R., Thompson J. V. y Cantwell G. E., (1964). A technique for the mass propagation of the DD-136 nematode. *Journal of Insect Pathology*, 6: 417-422.

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

Flanders, K. L., Miller J. M. y Shields E. J., (1996). In vivo production of *Heterorhabditis bacteriophora* 'Oswego' (Rhabditida: *Heterorhabditidae*), a potential

biological control agent for soil inhabiting insects in temperate regions. *Journal of Economic Entomology*, 89: 373-380.

Forst, S., Dowds, B., Boemare, N., y Stackebrandt, E., (1997). *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* spp. : insectos que matan insectos. *Revisiones Anuales en Microbiología*, 51 (1), 47-72.

Forst, S., & Neilson, K., (1996). Molecular biology of the symbiotic-pathogenic bacteria *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp. *Microbiological reviews*, 60(1), 21.

Friedman M. J., (1990). Commercial production and development. En: Gaugler, R.; Kaya, H.K. (Eds.). *Entomopathogenic nematodes in biological control*. Boca Raton, CRC Press, p. 153 - 172.

García del Pino, F., (1994). Los nemátodos entomopatógenos (Rhabditida: *Steinernematidae* y *Heterorhabditidae*) presentes en Cataluña y su utilización para el control biológico de insectos (Doctoral dissertation, PhD thesis, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona).

Gaugler, R., Campbell, JF, y McGuire, TR., (1989). Selección para búsqueda de huéspedes en *Steinernema feltiae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 54 (3), 363-372.

Gaugler, R., Lebeck, L., Nakagaki, B., y Boush, GM., (1980). Orientación del nematodo entomógeno *Neoplectana carpocapsae* a dióxido de carbono. *Entomología ambiental*, 9 (5), 649-652.

Gaugler, R., Han, R., (2002). Production technology. In: Gaugler, R. (Ed.), *Entomopathogenic Nematology*. CABI Publishing, Oxon, UK, pp. 289–310.

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

Georgis, R., (1992). Presente y futuro para los productos de nemátodos entomopatógenos. *Biocontrol Science and Technology*, 2 (2), 83-99.

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. S. y Georgis R. (1998). Entomopathogenic nematodes. En: Hall, F.R.; Menn, J.J. (Eds.). *Methods in biotechnology*. Vol. 5. Biopesticides: Use and delivery. Totowa, Humana Press. P. 271 - 299.

Grifaldo, A. 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.

Grijalva, T., e Iván, A., (2014). Evaluación de cuatro medios sólidos de crecimiento para la producción in vitro del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis bacteriophora*.

Guerra, S., Elena, B., Chacón, J. G., Muñoz, F., y Caicedo, A. M., (2014). Evaluation of pathogenicity *Xenorhabdus* spp. natives in Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 16(1), 111-118.

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

Hadwiger, L. A., y Loschke, D. C., (1981). Comunicación molecular en interacciones huésped-parásito: polímeros de hexosamina (quitosano) como compuestos reguladores en interacciones específicas de raza y otras. *Phytopathology* , 71 (7), 756-762.

Hajek, AE., (2004). Enemigos naturales: una introducción al control biológico. Prensa de la Universidad de Cambridge.

Kaya, H. K. y Stock, S. P., (1997). Techniques in insect nematology. Manual of techniques in insect pathology. Lawrence Lacey. Eds. Academic Press, Inc. San Diego. Capítulo 6. P. 281-324.

Lewis, E. E., Gaugler, R., y Harrison, R., (1993). Response of cruiser and ambusher entomopathogenic nematodes (*Steinernematidae*) to host volatile cues. *Canadian journal of Zoology*, 71(4), 765-769.

Lewis, E. E., Gaugler, R., y Harrison, R., (1992). Entomopathogenic nematode host finding: response to host contact cues by cruise and ambush foragers. *Parasitology*, 105(2), 309-315.

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

Martín, A., Serrano, S., Santos, A., Marquina, D., & Vázquez, C., (2010). Bioluminiscencia bacteriana. *REDUCA (Biología)*, 3(5).

Mata, H., (2014). Manejo integral de caña de azúcar. INIFAP.

Ongley, E. D., (1997). Lucha contra la contaminación agrícola de los recursos hídricos (No. 55). Food & Agriculture Org.

Ortega, M. D. J., Del Rincón, M. C., Basurto, R., Ibarra, J. E., y Toledo, J., (2012). Supplementary Material to " Phoresis between *Serratia marcescens* and *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae) during Infection of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) Larvae". *Florida Entomologist*, 95(1).

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

Peggy Greb., (2006). *USDA Agricultural Research Service, Bugwood.org. USA.*

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

Poinar G. O. Jr., (1990). Taxonomy and biology of *Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*. En R. Gaugler y H.K. Kaya (Eds.). *Entomopathogenic Nematodes in biological control*. Boca Ratón, Florida, USA. (pp. 23-61).

Pye, AE, y Burman, M., (1981). *Neoplectana carpocapsae*: acumulaciones de nematodos en gradientes químicos y bacterianos. *Parasitología experimental*, 51 (1), 13-20.

Ramírez M., (1995). Susceptibilidad de *Mpcis latipes* (Guenée) (Lepidóptera: Noctuidae), al nemátodo entomopatógeno *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar. División de estudios de postgrado. Universidad de Colima.

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

Richarson, P. N., (1986). Nematodes parasites of mushroom flies; their use as biological control agents, In "Cultivating Edible Fungi". Elsevier (P. J. Wuest, et al.) pp. 385-394.

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

Sáenz A. A. y Olivares W., (2008). Capacidad de búsqueda de *Steinernema* sp. SNIO 198 (Rhabditida: Steinernematidae) para el control de *Sagalassa valida* Walker (Lepidoptera: Glyphipterygidae). *Revista Colombiana de entomología*, 34 (1): 51-56.

SAGARPA, (2007). Estudio de gran visión para la identificación de necesidades de riego y drenaje en las zonas de abasto cañeras y propuestas de tecnificación en zonas potenciales como base para el desarrollo de proyectos de inversión. Etapa I. 16 de septiembre del 2014, [http://www.infocana.gob.mx/materiales/Estudios/INFORME\\_FINAL.pdf](http://www.infocana.gob.mx/materiales/Estudios/INFORME_FINAL.pdf).

SEGOB, (2014). Programa nacional de la agroindustria de la caña de azúcar. [http://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5343244&fecha=02/05/2014](http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5343244&fecha=02/05/2014). México

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

Shapiro-Ilan D. I., Gaugler R., Tedders W. L., Brown I. y Lewis E. E., (2002). Optimization of inoculation for *in vivo* production of entomopathogenic nematodes. *Journal of Nematology*, 34: 343 - 350.

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

Stock S. 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.

Thomas G.M., y Poinar, G. O., Jr., (1979). *Xenorhabdus* gen.nov., a genus of entomopathogenic, nematophilic bacteria of the family Enterobacteriace. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 29, 352-360.

Woodring, J. L. y Kaya H. K., (1988). *Steinernematid and Heterorhabditid Nematodes: a handbook of techniques*. South Coop. Ser Bull. Arkans. Agric. Exp. Stn. Fayetteville. 31: 1-130. 249.

## 11. ANEXOS

### **Caña de azúcar**

El cultivo de la caña de azúcar es de suma importancia para nuestro país, ya que en los últimos diez años se han sembrado más de 650,000 hectáreas por año (SAGARPA, 2007). Esto ha resultado en cosechas anuales de 48 millones de toneladas de caña de azúcar en promedio, las cuales generan una derrama económica de 30 mil millones de pesos anuales (SAGARPA, 2007). Morelos es uno de los Estados con más producción anual de este cultivo con 249,638 toneladas, que equivalen a \$1,900,000,000 (mil novecientos millones de pesos) (Diario de Morelos, 2012), y por tal motivo esta actividad se convierte también en una de las más importantes para el Estado (SEGOB, 2014).



Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 30 de Noviembre del 2018

### COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Luis Caspeta Guadarrama (Tutor principal)  
Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez (Co Tutor)  
Dr. Juan Manuel Caspeta Mandujano  
Dr. Guadalupe Peña Chora  
M en C Laura Patricia Lina Garcia

Tesis: "Propagación del nemátodo entomopatógeno  
*Caenorhabditis brenneri*

Alumno que la presenta a revisión: **TANIA MAREL GUADARRAMA AVILA**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

## VOTO

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

ATENTAMENTE

DR. LUIS CASPETA GUADARRAMA



Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 30 de Noviembre del 2018

### COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Luis Caspeta Guadarrama (Tutor principal)  
Dr. Victor Manuel Hernández Velázquez (Co Tutor)  
Dr. Juan Manuel Caspeta Mandujano  
Dr. Guadalupe Peña Chora  
M en C Laura Patricia Lina García

Tesis: "Propagación del nemátodo entomopatógeno  
*Caenorhabditis brenneri*

Alumno que la presenta a revisión: **TANIA MAREL GUADARRAMA AVILA**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

## VOTO

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

ATENTAMENTE

DR. VICTOR MANUEL HERNANDEZ VELAZQUEZ



Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 30 de Noviembre del 2018

### COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Luis Caspeta Guadarrama (Tutor principal)  
Dr. Victor Manuel Hernández Velázquez (Co Tutor)  
Dr. Juan Manuel Caspeta Mandujano  
Dr. Guadalupe Peña Chora  
M en C Laura Patricia Lina García

Tesis: "Propagación del nemátodo entomopatógeno  
*Caenorhabditis brenneri*

Alumno que la presenta a revisión: **TANIA MAREL GUADARRAMA AVILA**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

**VOTO**

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

ATENTAMENTE

DR. JUAN MANUEL CASPETA MANDUJANO



Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 30 de Noviembre del 2018

### COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Luis Caspeta Guadarrama (Tutor principal)  
Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez (Co Tutor)  
Dr. Juan Manuel Caspeta Mandujano  
Dr. Guadalupe Peña Chora  
M en C Laura Patricia Lina García

Tesis: "Propagación del nemátodo entomopatógeno  
*Caenorhabditis brenneri*

Alumno que la presenta a revisión: **TANIA MAREL GUADARRAMA AVILA**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

## VOTO

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

ATENTAMENTE

DR. GUADALUPE PEÑA CHORA



Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 30 de Noviembre del 2018

### COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Luis Caspeta Guadarrama (Tutor principal)  
Dr. Victor Manuel Hernández Velázquez (Co Tutor)  
Dr. Juan Manuel Caspeta Mandujano  
Dr. Guadalupe Peña Chora  
M en C Laura Patricia Lina Garcia

Tesis: "Propagación del nemátodo entomopatógeno  
*Caenorhabditis brenneri*

Alumno que la presenta a revisión: **TANIA MAREL GUADARRAMA AVILA**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

## VOTO

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

ATENTAMENTE

M en C LAURA PATRICIA LINA GARCIA