



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

CONSERVACIÓN DEL NEMATODO ENTOMOPATÓGENO *Oscheius myriophila*) EN CUATRO DIFERENTES TEMPERATURAS.

TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

THANIA GISEL RODRIGUEZ OCAMPO.

DIRECTOR: DR. VÍCTOR MANUEL HERNÁNDEZ VELAZQUEZ

CO-DIRECTOR: M en B. TANIA MAREL GUADARRAMA AVILA

CUERNAVACA, MORELOS

JUNIO, 2022

DEDICATORIA

A dios por haber puesto en mi camino a dos personas maravillosas y únicas, MIS PADRES

¡¡Wenses Rodríguez Sánchez & Eloina Ocampo Flores!!

Porque gracias a su cariño, guía y apoyo he llegado a realizar uno de los anhelos más grandes de mi vida, fruto del inmenso apoyo, amor y confianza que en mi se depositó para seguir y culminar con mi carrera este éxito también es SUYO. Por ello y por todo lo que me han dado, mil gracias PAPÁS.

Papá gracias por siempre desear y anhelar lo mejor para mi vida, gracias por cada consejo, por cada una de tus palabras que me guiaron y por eso dedico te dedico esta tesis; la dedico en acto de reconocimiento por tu esfuerzo y compromiso con mi vida y con mis metas. Te amo papá, gracias por ser el mejor.

Mamá gracias por siempre cuidarme, guiarme y apoyarme en cada paso, porque cuando no tenía a quien acudir, sabía que podía contar contigo, cuando todos los caminos se cerraban, tu puerta era la única siempre abierta, y cuando todo se ponía difícil ahí estabas tú a mi lado diciéndome que todo saldría bien. El lucero que más brilla en mi cielo eres tú y sé que siempre estarás cuidándome y guiándome desde el cielo. Te amo mamá, gracias por ser la mejor.

CON ADMIRACIÓN Y RESPETO

A Shanel Rodríguez Ocampo, que más allá de ser mi hermanita es mi amiga y compañera de toda la vida, gracias por siempre escucharme, apoyarme, aconsejarme y siempre estar conmigo (*No hay mejor amiga que una hermana y no hay mejor hermana que tu*) te amo nanis.

A Vanessa Rodríguez por siempre estar conmigo y apoyarme en todo momento te quiero mi niña.

A mis abuelitos Lucio Rodríguez y Margarita Sánchez, porque con su amor, paciencia, esfuerzo, cariño y apoyo incondicional durante todo este proceso me han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más. Por estar conmigo en todo momento muchas gracias.

A dauto Ocampo y Juana Flores, gracias por estar siempre conmigo y por todo su amor, a mi abuelita por siempre haber estado presente como mi mamá en cada una de mis metas, gracias a los dos por siempre apoyarme, aconsejarme y escucharme. Por estar conmigo en todo momento muchas gracias.

A Miguel ángel Duran, muchas gracias por que sin duda supiste estar conmigo en cada paso, creíste en mí y sin duda me apoyaste y guiaste cuando más te necesite. Sé que siempre estarás cuidándome y guiándome desde el cielo y siempre te recordare con gran amor.

A mis amigas con las que compartí maravillosos momentos durante la carrera Ericka Velázquez, Yareli Jaime y Karla soriano. Muchas gracias por todos los bonitos recuerdos y por su apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

CON ADMIRACIÓN Y RESPETO

Al Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez, mi más amplio agradecimiento por su apoyo, guía, confianza, comprensión y paciencia. Por brindarme su conocimiento y darme la oportunidad de formar parte de su equipo de laboratorio para realizar este proyecto.

Con gratitud y cariño

A la MB. Tania Marel Guadarrama Ávila, por su conocimiento, paciencia, tiempo y dedicación que me brindo durante este proyecto. Muchas gracias por siempre estar pendiente a cualquier observación, por la comprensión y apoyo incondicional en todo momento.

A mi comité sinodal, Dr. Juan Manuel Caspeta Mandujano, Dr. Edgar Martínez Fernández, Dr. Guadalupe Peña Chora y la Dra. Mary Carmen Torres Quintero, gracias por su apoyo, confianza, comprensión y compromiso con este proyecto, por brindarme tiempo en cada uno de mis seminarios de investigación y estar pendiente a cualquier observación, por su enorme conocimiento y aportación en este proyecto, muchas gracias.

A todos mis compañeros de laboratorio por sus consejos, observaciones, conocimientos y apoyo en cada seminario de grupo a todos ustedes mi gratitud y cariño.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE CUADROS	6
1.INTRODUCCIÓN	7
2.ANTECEDENTES	8
2.1 Nematodos entomopatógenos.....	8
2.2 Comportamiento de los nematodos entomopatógenos	8
2.3 Ciclo de vida de los nematodos entomopatógenos.....	9
2.4 Asociación nematodo-bacteria	10
2.5 Biología de las Familias Steinernematidae y Heterorhabditidae.....	11
2.6 Conservación en almacenamiento de los nematodos entomopatógenos	11
2.7 Antecedentes directos de <i>Oscheius myriophila</i>	14
3. JUSTIFICACIÓN	16
5. OBJETIVOS	17
5.1 Objetivo general	17
5.2 Objetivos específicos	17
6. MATERIALES Y MÉTODOS	18
6.1 Material biológico	18
6.1.1 Cría de <i>Galleria mellonella</i>	18
6.1.2 Producción del Nematodo entomopatógeno (<i>Oscheius myriophila</i>)	19
6.2 Cuantificación y almacenamiento de juveniles infectivos.....	20
6.3 Cuantificaciones del Nematodo entomopatógeno (<i>Oscheius myriophila</i>).....	20
6.4 Bioensayos de patogenicidad de <i>Oscheius myriophila</i>	21
6.5 Análisis estadísticos	21
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
7.1 Supervivencia de Juveniles infectivos (JIs).....	22
7.2 Patogenicidad de juveniles infectivos sobre <i>Galleria mellonella</i>	23
8. CONCLUSIÓN	26
9. RECOMENDACIONES	¡Error! Marcador no definido.
LITERATURA CITADA	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de los nematodos entomopatógenos de las familias <i>Steinernematidae</i> y <i>Heterorhabditidae</i> (Ehlers, 2001).	9
Figura 2. Bacterias dentro del nematodo entomopatógeno. A) <i>Photorhabdus. luminescens</i> colonizando el intestino del nematodo entomopatógeno <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> B) Vesícula de nematodo entomopatógeno <i>Steinernema carpocapsae</i> colonizado por <i>Xenorhabdus. nematophila</i> . (Ciche <i>et al.</i> , 2006).	10
Figura 3. Factores que influyen la supervivencia de los nematodos entomopatógenos.	12
Figura 4. Ingredientes de dieta de <i>Gallería mellonella</i>	18
Figura 5. Esquema general del proceso de producción de los nematodos entomopatógenos.	19
Figura 6. Supervivencia de los juveniles infectivos a 180 días en distintas temperaturas. Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p<0.05$).	23
Figura 7. Larvas de <i>Galleria mellonella</i> infectadas por <i>Oscheius myriophila</i>	24

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Especies de nematodos entomopatógenos y sus temperaturas en almacenamiento	14
Cuadro 2. Cepa del nematodo entomopatógenos del cepario del laboratorio de Control Biológico, perteneciente al Centro de Investigación en Biotecnología.	19
Cuadro 3. Porcentaje de patogenicidad de juveniles infectivos sobre <i>Galleria mellonella</i> durante 180 días a diferentes temperaturas. Se muestra su promedio y Desv. Estándar. Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p<0.05$). (N/A = JIs no viables).	23

1.INTRODUCCIÓN

Los nematodos entomopatógenos (NEPs) han sido utilizados como una alternativa ecológica para el manejo integrado de plagas, debido a que no contaminan el ambiente ni provocan problemas de salud a los humanos. Son organismos parásitos obligados de insectos, que se utilizan como agentes de control biológico, sus estadios juveniles parasitan a sus hospederos, penetrando directamente la cutícula o a través de las aperturas naturales como boca, ano y espiráculos; las bacterias que se introducen junto con el parásito se multiplican rápidamente y matan al hospedero, permitiendo que los nematodos crezcan y maduren sobre el tejido en descomposición, y convirtiéndose posteriormente en adultos (Boemare, 2002).

Estos microorganismos establecen una relación mutualista con bacterias de la familia Enterobacteriaceae, las cuales requieren de este hospedero para obtener protección y lograr diseminarse de un insecto a otro. Las 2 familias más importantes y estudiadas son Steinernematidae y Heterorhabditidae, la primer familia se asocia con bacterias del género *Xenorhabdus* y la segunda establece su relación con bacterias del género *Photorhabdus*, así teniendo un amplio rango de hospederos tales como lepidópteros, coleópteros y dípteros (Dunphy y Thurston, 1990).

Sin embargo, factores abióticos como temperaturas extremas, humedad, pH, radiación ultravioleta y textura del suelo pueden disminuir su eficiencia y supervivencia del juvenil infectivo (JI), ya que, en general la actividad térmica en campo de los steinernemátidos se encuentra entre 3-14 °C y para los heterorhabdítidos, entre 10-16 °C, por otro lado en condiciones de almacenamiento los steinernemátidos se conservan mejor a temperaturas entre 8 a 15 °C, sobreviviendo de 6 a 9 meses, mientras que los nematodos heterorhabdítidos sobre las mismas condiciones, sobreviven por 3 a 4 meses (Kaya y Stock, 1997).

En base a lo anterior, el objetivo de este trabajo es evaluar a que temperatura de almacenamiento se favorece la supervivencia y patogenicidad de la cepa nativa del estado de Morelos, MC5 (*Oscheius myriophila*), evaluando cuatro diferentes temperaturas 8, 12, 20 y 27 °C con el propósito de mantenerlos viables durante periodos más prolongados de almacenamiento.

2.ANTECEDENTES

2.1 Nematodos entomopatógenos

Pertenecen al Phylum Nematoda, de la clase Secernentea, del orden Rhabditida. Son organismos que han evolucionado dentro del grupo general de nematodos a solo infectar insectos, con un amplio rango de hospederos, se caracterizan principalmente por ser denominados gusanos redondos o cilíndricos, son multicelulares, semitransparentes, no segmentados, anillados superficialmente, con simetría bilateral.

Morfológicamente son similares al resto de los nematodos fitoparásitos y de vida libre, así mismo presenta un tracto alimentario que 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, miden alrededor de 0.5 mm de largo. Carecen de sistema circulatorio y respiratorio, pero cuentan con sistema excretor, nervioso, digestivo, reproductivo y muscular (Kaya y Stock, 1997).

Comprende un estado de huevo, cuatro estados juveniles y un estado adulto. El tercer estadio juvenil es el infectivo, llamado en ocasiones “larvas dauer”, es la única fase del ciclo biológico del nematodo que se encuentra fuera del insecto; este estadio infectivo transporta la bacteria simbiote en su intestino, y es el encargado de sobrevivir en el medio hasta que localiza un nuevo hospedero (Poinar Jr, 1993).

Los JIs están adaptados para sobrevivir por largos periodos en el suelo, ya que su cutícula de segundo estadio los protege de la desecación y otros tipos de estrés ambiental (dicha cutícula se pierde durante la penetración en un nuevo insecto hospedero) (Campbell y Gaugler, 1991). Sin embargo, también pueden sobrevivir durante semanas o incluso meses gracias a sus reservas de energía, sin necesidad de un hospedero (Hatab y Gaugler, 1999).

2.2 Comportamiento de los nematodos entomopatógenos

Los juveniles infectivos son el único estadio de vida libre de los nematodos entomopatógenos los cuales presentan diferentes estrategias para localizar a sus hospedadores (Kaya y Gaugler, 1993).

Dentro de estas estrategias, encontramos la de ser cazador o acechador:

En el caso del cazador se caracterizan por ser muy móviles y responder activamente a estímulos físicos y químicos; además, se encuentran adaptados a parasitar especies subterráneas y sedentarias. Se ha observado que estos nematodos poseen la capacidad de orientar sus movimientos hacia los hospedadores, en primer lugar, recopilando información de los recursos disponibles, para luego realizar una búsqueda más localizada y restringidas (Campbell y Gaugler, 1993).

Por otro lado, los acechadores suelen levantar su cuerpo del sustrato (excepto la porción posterior) y lo ondulan moviéndose de lado a lado, esto favorece la unión a sus hospederos, permitiendo que el nematodo pueda subir más fácilmente sobre el insecto que pasa (Campbell y Gaugler, 1993).

2.3 Ciclo de vida de los nematodos entomopatógenos

Una vez que el nematodo entomopatógeno (NEP) localiza a su hospedero, este ingresa a través de las aberturas naturales (boca, ano y espiráculos) y en algunos casos a través de la cutícula, siendo el caso de los JI de los heterorabditidos que pueden penetrar el insecto raspando la cutícula, debido a que poseen una estructura de queratina que se asemeja a un pequeño diente, llegando hasta el hemocele, una vez dentro del insecto este regurgita o defeca la bacteria en la hemolinfa del insecto (Poinar Jr, 1976).

La bacteria prolifera en el cuerpo del insecto y alcanza altas densidades, en este punto produce diversos compuestos antimicrobianos que suprimen el crecimiento de microorganismos antagónicos creando así un ambiente favorable para la reproducción y desarrollo del nematodo, así mismo estos se alimentan de la biomasa bacteriana y de los tejidos del insecto metabolizados por la bacteria (Koppenhofer y Fuzy, 2006) Por último, la

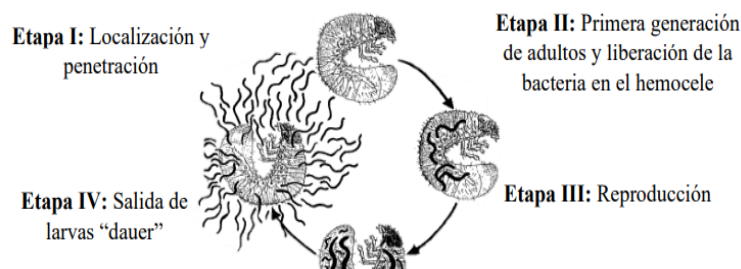


Figura 1. Ciclo de vida de los nematodos entomopatógenos de las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae (Ehlers, 2001).

reproducción del nematodo continua hasta que la reserva de alimento que proporciona el hospedero es insuficiente para continuar con un nuevo ciclo. Una vez que la reserva alimenticia no es suficiente, el JI adquiere la bacteria simbiote alimentándose de los tejidos del cadáver del insecto, para posteriormente abandonarlo en busca de un nuevo hospedero (Stock, 2015).

2.4 Asociación nematodo-bacteria

Los nematodos entomopatógenos de las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae están asociados simbióticamente con bacterias de los géneros *Xenorhabdus* y *Photorhabdus*, respectivamente. Las bacterias se localizan en un receptáculo presente en la unión entre el esófago y el intestino, conocida como vesícula en el caso de los steinernemátidos, o en el lumen del intestino en heterorhabdítidos (Dunphy y Thurston, 1990).

Una vez que este se encuentra en el interior del hospedero regurgita o defeca las bacterias, estas reprimen el sistema inmunitario del insecto, inhibiendo la acción de enzimas antibacterianas, permitiendo su rápida multiplicación, produciendo la bacteria antibióticos que inhiben el crecimiento de otros microorganismos en el cadáver del insecto estableciendo un cultivo monoxénico causando la muerte del huésped. Posteriormente los nematodos se desarrollan y reproducen dentro del cadáver del insecto alimentándose de los tejidos degradados por la bacteria (Poinar Jr et al., 1980).

La relación entre el nematodo y la bacteria se enmarca en una clásica relación mutualista, ya que el nematodo provee a la bacteria protección contra el medio ambiente externo y también le da protección contra la respuesta inmunológica del hospedero. Así mismo, el nematodo es un medio de transporte para la bacteria del cadáver del insecto al hemocele, por otro lado, la contribución de la bacteria en esta asociación es la de proveer de nutrientes al nematodo (Akhurst, 1982).

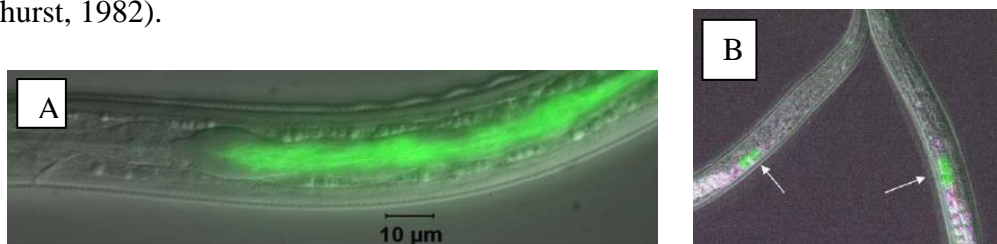


Figura 2. Bacterias dentro del nematodo entomopatógeno. A) *P. luminescens* colonizando el intestino del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis bacteriophora* B) Vesícula de nematodo entomopatógeno *Steinernema carpocapsae* colonizado por *Xenorhabdus nematophila* (Ciche et al., 2006).

2.5 Biología de las Familias Steinernematidae y Heterorhabditidae

Las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae son parásitos de un gran número de especies de insectos, y pueden parasitar cada uno de los estadios (larva, pre-pupa, pupa y adulto) de los insectos hospederos. En el caso de los infectivos juveniles de la familia Steinernematidae el tercer estadio transporta la bacteria mutualista *Xenorhabdus* spp. en el receptáculo intestinal (Poinar Jr et al., 1980).

Las hembras son grandes, con longitud del cuerpo variable, cutícula lisa o anulada, sin campos laterales, poro excretor visible, cabeza redonda o trunca y su sistema reproductor, por otro lado, los machos son de menor tamaño que las hembras, presentando bursa ausente, con papilas genitales. El infectivo juvenil presenta un estoma hundido, con o sin cutícula del segundo estadio juvenil, los campos laterales pueden tener de 4-9 hendiduras o campos laterales y la cola es conoide o filiforme (Nguyen y Smart Jr, 1996).

Sin embargo, la familia Heterorhabditidae, en el caso de los juveniles infectivos transportan la bacteria simbiótica *Photorhabdus* sp. El poro excretor se localiza en la parte posterior del anillo nervioso. Los NEPs hermafroditas (adultos de primera generación) presentan una cabeza trunca, 6 labios cónicos bien desarrollados, estoma ancha, poro excretor usualmente posterior al final del esófago. Las hembras amfimicticas (adulto de segunda generación) son más chicas que las hembras hermafroditas, presentan papila labial prominente, sistema reproductivo amfidelfico. Por otro lado, los machos presentan un testículo reflejado, cabeza de la espícula corta, y bursa con 9 pares de papilas genitales (Nguyen y Smart Jr, 1996).

En bacterias del género *Photorhabdus* se puede observar luminiscencia, a diferencia de *Xenorhabdus*. Los cultivos de *Photorhabdus* resplandecen y en los cadáveres de insectos infectados pueden ser detectadas en la oscuridad. *Xenorhabdus* es catalasa negativa, mientras que *Photorhabdus* es positiva (Thomas y Poinar Jr, 1979); (Boemare y Akhurst, 1998).

2.6 Conservación en almacenamiento de los nematodos entomopatógenos

Una de las principales causas que impiden su sobrevivencia de los NEPs tanto en almacenamiento como en el ambiente, es su sensibilidad a los extremos ambientales. Un factor importante es la temperatura, la cual influye en varios procesos de su metabolismo, se

ha observado que la temperatura puede modificar la velocidad a la cual los nematodos utilizan sus reservas de alimentos (lípidos, proteínas y carbohidratos) (Kaya y Gaugler, 1993). Así mismo, los almacenes que se encuentran a temperatura ambiente también requiere una tolerancia considerable al calor (Selvan *et al.*, 1933).

Por lo tanto, para una selección de un nematodo entomopatógeno en el control de una plaga de insectos, es importante considerar varios factores como: el rango de hospederos del nematodo, la búsqueda de hospederos, la tolerancia de los factores ambientales y sus efectos sobre la supervivencia y la eficacia (temperatura, radiación solar, tipo de suelo, humedad, la patogenicidad del insecto objetivo y estrategia de alimentación) ya que las condiciones ambientales pueden limitar la supervivencia, reproducción y desarrollo de los nematodos (Kaya, 1990).



Figura 3. Factores que influyen la supervivencia de los nematodos entomopatógenos (Jagdale y Grewal, 2003; Popiel *et al.*, 1987).

Kaya y Stock, (1997), nos dicen que pueden ser almacenados manteniendo una alta viabilidad en un rango de temperaturas que oscilan entre 4-15 °C durante 6 a 9 meses para steinernemátidos y de 3 a 4 meses para heterorhabdítidos, asimismo, menciona que las temperaturas inferiores a 9 °C y superiores a 30 °C, afectan la persistencia de JIs, variando entre las especies, y que casi todas las especies de NEPs son activas a temperatura ambiente (25±2 °C).

Especies como *H. bacteriophora* HP88 presentan alta tolerancia al calor, prolongando su supervivencia hasta 6 horas a 37 °C, y no solo en el caso *H. bacteriophora* HP88, sino también *H. baujardi* LPP7, muestra una alta supervivencia a 24 °C (Segal y Glazer, 2000).

Sin embargo, su tolerancia se ve inducida por su reserva lipídica en algunas especies, ya que, su infectividad disminuye acorde a su tiempo de almacenamiento como lo es para steinernemátidos que a temperaturas de 8 °C favorece su supervivencia hasta por 180 días, asimismo disminuyendo su infectividad acorde a esta. Por parte en heterorhabdítidos hay una correlación inversa, ya que, a pesar de tener una alta cantidad de lípidos en las temperaturas de 8, 16 y 20 °C su infectividad se pierde a los 60 días (Andaló *et al.*, 2011). Wright y Perry, (2002) nos dicen que la cantidad de lípidos son de suma importancia ya que tales reservas de energía influyen en la viabilidad e infectividad de los nematodos entomopatógenos.

Los steinernemátidos están asociados a bajas temperaturas, esto puede depender más de su tolerancia a las condiciones ambientales, que a la cantidad de reservas energéticas (Grewal, 2000), debido a que se induce una inactividad en la eficiencia para infectar, sin embargo, cuando estos son expuestos a sus temperaturas naturales de crecimiento los JIs son capaces de incrementar su persistencia en el medio, esto se debe a que disminuye su actividad enzimática y gastos metabólicos, comenzando a acumular trehalosa y sólo a 20 °C logran activarse como lo es *S. carpocapsae* que entra en inactividad a 5 °C (Kaya, 1990).

La tolerancia a bajas temperaturas se debe a una aclimatación de donde fueron aislados, por ejemplo, *S. feltiae*, *S. riobrave* y *S. kushidai*, acumulan trehalosa durante su aclimatación a 5, 10 o 15 °C. Se sabe que la tolerancia a permanecer en ambientes fríos o calientes se debe a esta acumulación de trehalosa, la cual difiere entre las distintas especies de nematodos. La principal función de la trehalosa es proteger las membranas celulares durante la congelación y de deshidratación inducida, reemplazando el agua de sus estructuras celulares. Especies como *S. carpocapsae*, *S. glaseri* y *S. feltiae*, cuando se aclimatan a temperaturas frías o cálidas y luego se estresan por estas, su virulencia se conserva en gran parte sobre *G. mellonella* (Jagdale y Grewal, 2003).

Cuadro 1. Especies de nematodos entomopatógenos y sus temperaturas en almacenamiento.

ESPECIE	TEMPERATURA	REFERENCIA
<i>Steinernema feltiae</i>	5 a 15 °C	(Jagdale y Grewal, 2003)
<i>Steinernema riobrave</i>		
<i>Steinernema kushidai</i>		
<i>Steinernema carpocapsae</i>	8 a 16 °C	(Molina et al., 2006)
<i>Steinernema glaseri</i>		
<i>Steinernema arenarium</i>	12 a 16 °C	
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	20 a 24 °C	
<i>Heterorhabditis HP88</i>		
<i>Heterorhabditis baujardi LPP7</i>		
<i>Heterorhabditis sp. CCA</i>	8 a 20 °C	(Andaló et al., 2011)
<i>Heterorhabditis sp. JPM4</i>		
<i>Oscheius myriophilus</i>	25 °C	(Ghavamabad et al., 2021)
<i>Oscheius microvillin sp.</i>	25 °C	(Zhou et al., 2017)

2.7 Antecedentes directos de *Oscheius myriophila*

El nematodo entomopatógeno MC5-2014 (*Oscheius myriophila*) forma parte del cepario del laboratorio de control biológico del Centro de Investigación en Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos y se obtuvo de un relevamiento de 14 suelos en cultivos de caña de azúcar, en suelo de textura franco-arenosa con un pH de 6.4 perteneciente al municipio de Tepalcingo, Morelos.

La determinación de la especie se realizó mediante técnicas morfológicas y morfométricas buscando una estoma tubular con un cuerpo faríngeo cilíndrico hinchado y un metacorpúsculo en la parte basal. Obteniendo en hembras un rango de longitud corporal de 750 a 1200 µm y

en machos 720 a 910 μm , mientras que los anchos máximos correspondientes del cuerpo fueron de 30 a 60 μm y de 20 a 30 μm , respectivamente.

En el caso de los machos exhibieron bursa con una distribución de papilas 1 + 1 + 3 + 3, y las hembras una vulva ubicada en la mitad del cuerpo. Para la identificación molecular se utilizó la región ITS del ADN ribosómico. En base a lo anterior, se determinó que el aislado era *Oscheius myriophila*, y es considerado el primer reporte para México (Castro *et al.*, 2020). Cuando se evaluó su patogenicidad en larvas de *G. mellonella*, se obtuvo que la concentración letal media (CL_{50}) de los nematodos fue de 4.732 JIs.

Teniendo en cuenta que el cultivo de la caña de azúcar está expuesto a la aplicación constante de insecticidas, herbicidas, fungicidas y fertilizantes.

Guadarrama, (2015), buscó la respuesta de mortalidad de *O. myriophila* y su capacidad infectiva sobre larvas de *D. magnificella*, después de ser expuesta a diferentes agroquímicos (busan®, monitor 600®, faena®, ridomil® y talstar®) que son utilizados regularmente en la industria agrícola.

Mostrando que *Oscheius myriophila* tiene un mayor porcentaje de mortalidad con el fungicida busan®, mientras que con el insecticida talstar® tiene un menor porcentaje.

Para el estudio de la capacidad infectiva se encontró que esta cepa mantiene su capacidad de infección aún después de haber sido expuesta a talstar® y al herbicida faena®, produciendo un promedio de 2,163 y 598 NEPs respectivamente (la infección se realizó con un inóculo de 30 JIs por larva para cada cepa).

El segundo estudio fue la producción *in vivo*, donde se evaluó la producción de JIs por larva de *G. mellonella* a diferentes concentraciones de inóculo (10, 30 y 50 JIs), así como el cálculo de la tasa de reproducción para cada caso, encontrando que en cuanto a la producción de NEPs no hay diferencias significativas entre las distintas concentraciones de inóculos iniciales, mientras que para el caso de la tasa de reproducción, ésta es mayor a partir de un inóculo de 10 JIs, y la menor a partir de 50 JIs (Cruz, 2015).

3. JUSTIFICACIÓN

Los nematodos entomopatógenos (NEPs) forman parte importante dentro de las diferentes estrategias de control biológico que se utilizan para regular las poblaciones de insectos plaga. La producción y el uso a gran escala de estos organismos se ha visto afectado en gran parte por la dificultad de mantenerlos viables durante largos periodos de almacenamiento. Lo anterior se debe principalmente a que cada aislado tiene requerimientos particulares para su adecuado mantenimiento y desarrollo en los ceparios de los laboratorios de investigación y de la industria, lo que eventualmente puede provocar la pérdida de cepas de gran importancia. En base a lo anterior, mantener en condiciones óptimas un cepario de NEPs permitirá tener un mejor control de las cepas en cuanto a su tiempo de desarrollo, viabilidad y almacenamiento.

El presente trabajo permitirá complementar la línea de investigación sobre la cepa MC5 (*Oscheius myriophila*), así como determinar cuál es la temperatura óptima. A la cual este nematodo puede desarrollarse adecuadamente y sobrevivir por periodos de tiempo más largos.

4. HIPÓTESIS

La temperatura de almacenamiento influye en la conservación y patogenicidad del nematodo entomopatógeno MC5 (*Oscheius myriophila*).

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

- Evaluar la conservación de la cepa MC5 (*Oscheius myriophila*) a cuatro temperaturas (8 °C, 12 °C, 20 °C y 27 °C) y su patogenicidad sobre larvas de *Galleria mellonella*.

5.2 Objetivos específicos

- Evaluar la conservación durante 12 meses de la cepa MC5 (*Oscheius myriophila*) a (8 °C, 12 °C, 20 °C y 27 °C)
- Evaluar la patogenicidad de la cepa MC5 (*Oscheius myriophila*) sobre *G. mellonella* durante su almacenamiento.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material biológico

6.1.1 Cría de *Galleria mellonella*

Se utilizaron botes de plástico transparente con capacidad de 1L, alrededor de la parte interna del bote se colocó papel bond. Posteriormente se colocaron 10 adultos, y al cabo de 10 días se abrieron y se recortó el papel donde se observó que habían ovipositado los huevos, posteriormente los cuadritos de papel se colocaron en botes de plástico de 1 L, con dieta a la mitad de su capacidad.

La dieta que se utilizó para la cría de *Galleria* está hecha a base de los siguientes ingredientes:

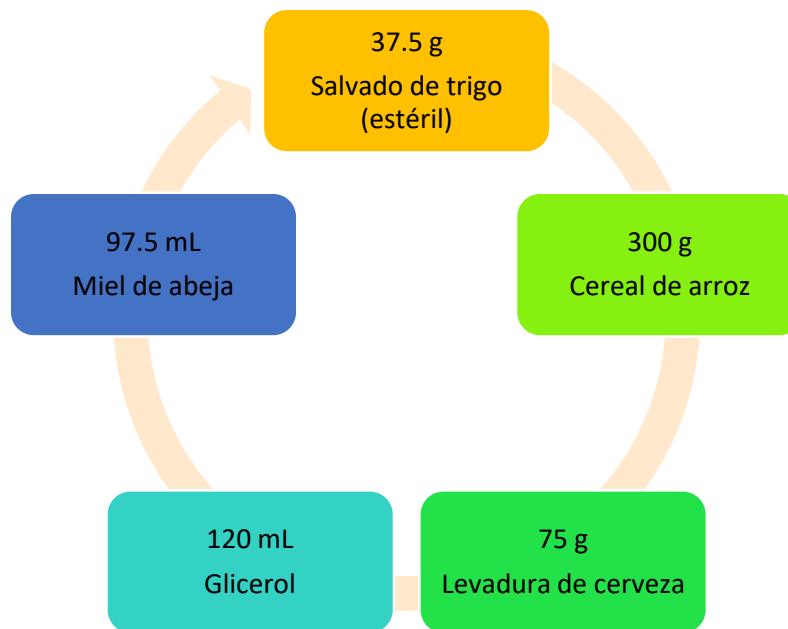


Figura 4. Ingredientes de dieta de *Gallería mellonella*.

Procedimiento: mezclar el cereal de arroz, salvado de trigo (estéril) y levadura de cerveza en un recipiente hondo; en un recipiente aparte calentar la miel y mezclarla con el glicerol, posteriormente verter poco a poco esta mezcla junto con los demás ingredientes secos y mezclar todo perfectamente.

6.1.2 Producción del Nematodo entomopatógeno (*Oscheius myriophila*)

Cepa	Especie	Bacteria simbiote	Hábitat	Referencia
MC5	<i>Oscheius myriophila</i>	<i>Serratia</i>	Suelo de caña de azúcar Tepalcingo	(Castro <i>et al.</i> , 2020)

Cuadro 2. Cepa del nematodo entomopatógenos del cepario del laboratorio de Control Biológico, perteneciente al Centro de Investigación en Biotecnología.

Para llevar a cabo la producción del nematodo se prepararon cajas Petri de 60x15 mm en las cuales se colocó un disco de papel filtro Whatman del N° 1 Figura 5 (A), posteriormente sobre el papel se colocaron cinco larvas de *G. mellonella* de sexto y/o séptimo instar, se añadieron 100 µL de suspensión con NEP por larva y se incubaron a temperatura ambiente Figura 5 (A y B).

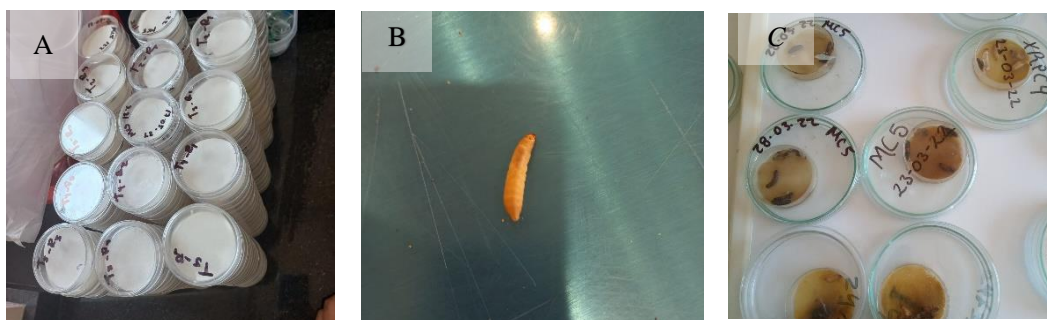


Figura 5. Esquema general del proceso de producción de los nematodos entomopatógenos.

Para monitorear que los nematodos se estaban reproduciendo adecuadamente, se observaron los cambios morfológicos en las larvas infectadas, principalmente que presentaran una apariencia flácida y que tomaran un cambio de coloración en el tegumento a las 48 horas posteriores a la infección, también se observó si había liberación de JIs en las cajas Petri. Posteriormente, las larvas infectadas se colocaron en trampas White (C) que consistieron en una tapa de caja Petri de 100 x 15 mm de diámetro y sobre esta caja se colocó la caja Petri de menor tamaño con 5 mL de agua destilada y se incubaron durante 10 días a temperatura ambiente para posteriormente hacer la colecta de JIs.

6.2 Cuantificación y almacenamiento de juveniles infectivos

Para llevar a cabo la cuantificación de JIs se utilizó el método propuesto por Woodring y Kaya (1988). Para lo cual se homogeniza la suspensión inicial contenida en frascos de cultivo Corning y posteriormente tomar 100 μ L, los cuales se depositan en una caja Petri. Posteriormente se realizó el conteo de los JIs vivos en un microscopio estereoscópico, repitiendo esto cinco veces y calculando el promedio de los conteos realizados.

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

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

Dónde:

A = Volumen de la suspensión concentrada a ser diluida.

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

C = Volumen final en mililitros de la nueva dilución.

D = Concentración de nemátodos deseada en la nueva dilución.

(Woodring y Kaya, 1988).

Una vez que realizamos lo descrito, se procedió a realizar el almacenamiento, utilizando frascos de cultivo Corning con capacidad de 50 mL en los cuales se colocaron 3000 JIs de la cepa *Oscheius myriophila*, y se aforó con agua destilada a un volumen de 40 mL, para posteriormente ser almacenados a las temperaturas de 8, 12, 20 y 27 °C, se almacenaron frascos para 1 año con la finalidad de evaluar muestras independientes.

6.3 Cuantificaciones del Nematodo entomopatógeno (*Oscheius myriophila*)

Las cuantificaciones fueron realizadas cada 15 días, con la finalidad de saber el porcentaje de supervivencia.

Se realizó tomando 4 frascos de cada una de las temperaturas 8, 12, 20 y 27 °C y con ayuda de una micropipeta se tomó de cada frasco 100 μ L de JIs y se hizo una cuantificación de JIs vivos, todo esto repitiéndolo 5 veces para posteriormente sacar un promedio de supervivencia.

6.4 Bioensayos de patogenicidad de *Osccheius myriophila*

Para llevar a cabo los bioensayos de patogenicidad se tomaron cuatro frascos al azar de cada una de las temperaturas (8 °C, 12 °C, 20 °C y 27 °C) y se hizo una cuantificación de JIs vivos y muertos de cada una de las temperaturas con ayuda del método propuesto por (Woodring y Kaya, 1988) una vez realizada la cuantificación se sacó el promedio de vivos y muertos, realizando esto cada 30 días.

Posteriormente al resultado obtenido de supervivencia en una caja Petri de (60 x 15mm) con un fondo doble de papel filtro de abertura media, de 60 mm de diámetro, se colocó 1 larva de *Galleria mellonella* de sexto o séptimo instar y se agregó la suspensión de 10 JIs vivos con 250 µL de agua destilada estéril.

Cada unidad experimental está formada por 10 larvas de *G. mellonella*, con cuatro repeticiones por temperatura. Se monitoreó la mortalidad a las 48, 72, 96 y 120 horas, considerando una larva muerta cuando presentó apariencia flácida y cambio en la coloración, además se verificó la presencia de nematodos con ayuda de un microscopio estereoscópico.

6.5 Análisis estadísticos

Para poder analizar los datos estadísticamente fueron transformados utilizando arcoseno, para posteriormente realizar un análisis de varianza (ANOVA). Para determinar si hubo diferencias estadísticas entre los diferentes tratamientos se aplicó la prueba de Tukey con un nivel de confianza del 0.05. Todos los análisis fueron hechos en el programa estadístico Rcomander.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

7.1 Supervivencia de Juveniles infectivos

En base a los resultados obtenidos a los 15 días de almacenamiento a las distintas temperaturas, se pudo observar que hubo una diferencia significativa ($P < 0.05$) en cuanto a la temperatura de 8 °C con respecto a las demás. Los resultados indican que almacenar los nematodos a 8 °C afecta drásticamente la supervivencia de los nematodos, debido a que esta disminuyó por completo al 0%, en comparación con los nematodos que fueron almacenados a las temperaturas 12, 20, 27 °C, en donde se observó que entre estas no hubo diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$) durante los primeros 105 días de almacenamientos, observando que a la temperatura de 12 °C la supervivencia fue de 93.33%, mientras que a 20 °C de 88% y a 27 °C del 85%.

Siendo así, observamos que fue hasta los 120 días, que pudimos encontrar una diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de supervivencia ($P < 0.05$) siendo de 37.33% para 27 °C y 42.67% a 20 °C, en comparación de la temperatura de 12 °C en la cual disminuyó al 66.67%.

Posteriormente a los 150 días de ser almacenados los JIs redujeron su porcentaje a 0% en las temperaturas de 20 y 27 °C, asimismo quedando en la temperatura de 12 °C con una supervivencia del 58.67% al cabo de 180 días de almacenamiento.

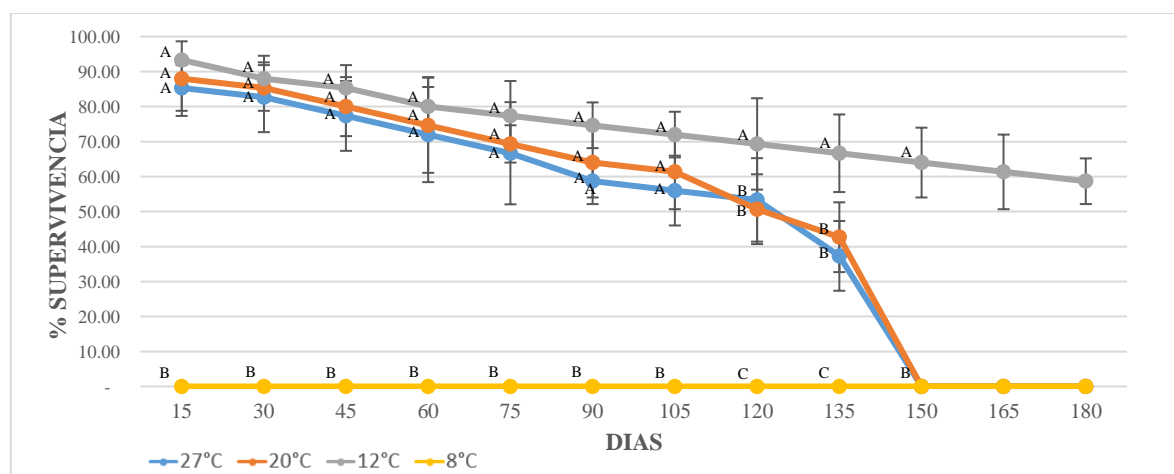


Figura 6. Supervivencia de JIs a los 180 días en distintas temperaturas. Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Se obtuvo que en concentraciones de 3,000 JIs en temperaturas de 20° y 27°C se pueden mantener hasta cuatro meses y medio, mientras que a 12°C se vieron beneficiados, ya que, su supervivencia no disminuye tan rápido y que va acorde al tiempo de almacenamiento. Por otro lado, temperaturas inferiores a 8 °C no favorecen a esta especie ya que, 15 días después de ser almacenados se murieron en su totalidad.

7.2 Patogenicidad de juveniles infectivos sobre *Galleria mellonella*

Para evaluar la patogenicidad de los nematodos almacenados a distintas temperaturas en *G. mellonella*, se utilizaron 10 JIs, de los frascos a 12, 20 y 27 °C, haciendo esto cada 30 días (Imagen 7). En base a los resultados obtenidos, se observó que a los 30 días los JIs seguían siendo capaces de infectar larvas de *G. mellonella* independientemente de la temperatura de almacenamiento ($P > 0.05$), manteniendo su porcentaje de infectividad en 97.5% para las temperaturas de 12 y 20 °C, y en 95% para la de 27 °C. Posteriormente a los 90 días se observó una diferencia estadísticamente significativa en la patogenicidad ($P < 0.05$) disminuyendo especialmente en la temperatura de 27 °C, con un porcentaje del 62.5%. Así mismo a los 120 días las temperaturas de 20 y 27 °C se redujeron a un 55 y 45 % su patogenicidad.

Sin embargo, a los 180 días los JIs que fueron almacenados a 12 °C no se vieron afectados en su supervivencia y patogenicidad, ya que la mantuvieron a niveles aceptables (cuadro 3).

Cuadro 3. Porcentaje de patogenicidad de JIs sobre *G. mellonella* durante 180 días a diferentes temperaturas. Se muestra su promedio y Desv. Estándar. Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$). (N/A = JIs no viables).

<i>Oscheius myriophila</i>			
DÍAS	12°C	20°C	27°C
30	97.5 ± 4.33 A	97.5 ± 4.33 A	95 ± 8.66 A
60	92.5 ± 8.29 A	85 ± 5 A	77.5 ± 4.33 A
90	87.5 ± 4.33 A	72.5 ± 8.29 AB	62.5 ± 8.29 B
120	80 ± 7.07 A	55 ± 5 B	45 ± 8.66 B
150	72.5 ± 8.29 A	N/A	N/A

180	67.5 ± 9.57 A	N/A	N/A
-----	---------------	-----	-----



Figura 7. Larvas de *G. mellonella* infectadas por *O. myriophila*.

De acuerdo a Kaya y Stock, 1997, los NEPs en condiciones de almacenamiento se conservan mejor a temperaturas de 4 a 15 °C de 6 a 9 meses para steinernemátidos y de 3 a 4 meses para heterorhabdítidos, y que bajas concentraciones de 1000 a 2000 JI/mL son ideales para su almacenamiento, así mismo afirmando que todas las especies son activas a temperatura ambiente (25±2 °C). Temperaturas sobre 30°C o bajo 9 °C los nematodos se ven afectados negativamente en la persistencia, variando entre especie de nematodo y de la región geográfica de origen (Kaya 1990).

Molina *et al.* 2006, afirma que temperaturas de 20 a 24 °C afectan la supervivencia de steinernemátidos y favorecen a heterorhabdítidos en almacenamiento hasta 1 mes, por otro lado, los steinernemátidos toleran temperaturas de 8 a 16 °C manteniendo su supervivencia hasta 3 meses al contrario de heterorhabdítidos que temperaturas inferiores a 16 °C afectan su supervivencia, debiéndose posiblemente a que obedecen a una adaptación térmica de donde fueron aislados. Por ejemplo, especies subtropicales como *S. glaseri* persiste en el medio a temperaturas entre 10 y 35 °C a diferencia de *S. carpocapsae* que persiste mejor entre 5 y 15 °C (Kaya 1990). Así posiblemente explicando por qué esta especie *Oscheius myriophila* se vio afectada su supervivencia a 8 °C, ya que las temperaturas de Tepalcingo Mor. durante el transcurso del año, generalmente varían de 13 °C a 34 °C y rara vez baja a menos de 9 °C o sobrepasa los 37 °C.

Molineux en 1985, afirma que temperaturas bajas inducen no solo inactividad, sino a un aumento en su persistencia en el tiempo a los JIs, ya que hay una disminución en la actividad enzimática y en los gastos metabólicos, comenzando una acumulación de trehalosa y reducción en los niveles de lípidos siendo característico de steinermatidos explicando su alta supervivencia a temperaturas bajas. Al parecer los JIs parecen experimentar en un periodo obligatorio de inactividad, indicando el establecimiento de un estado de diapausa, en el cual son incapaces inclusive de infectar hasta recuperar su viabilidad a temperatura de acondicionamiento, entrando a una inactividad, comenzando a acumular trehalosa y solo a 20 °C logran activarse como lo es *S. carpocapsae* que entra en inactividad a 5 °C Kaya (1990).

Andaló y colaboradores en 2011, evaluaron cuatro especies de NEPs, favoreciendo la temperatura de 8 °C a las especies de *S. carpocapsae*, ya que, su reserva de lípidos disminuyó al 75% y su infectividad a 72.5%, así mismo, para la especie *S. riobrave* que su reserva de lípidos disminuyó al 61.3 % y su infectividad a 62.5 % al cabo de 180 días, observando que a medida que el porcentaje de lípidos disminuye su infectividad también. Sin embargo, para heterorhabdítidos hubo una correlación inversa a 8 °C, por lo que, a pesar de tener una alta cantidad de lípidos en las temperaturas de 8, 16 y 20 °C su infectividad se perdió a los 60 días. De igual manera posiblemente explicando en *Oscheius myriophila* la disminución de su supervivencia e infectividad al cabo de 180 días y porque a comparación de las temperaturas de 20 y 27 °C que al cabo de cuatro meses disminuyó su supervivencia, ya que al estar en constante movimiento y activados constantemente su desgaste de trehalosa fue mayor, ha permanecido más tiempo.

8. CONCLUSIÓN.

Oscheius myriophila tolera tres temperaturas 12, 20 y 27 °C a diferentes tiempos, como lo es para 20 y 27 °C a 4 meses y para la de 12 °C hasta 6 meses o más, al contrario de la temperatura de 8 °C que se vieron perjudicados desde los 15 días al disminuir en su totalidad.

Así mismo, obteniendo que a una temperatura de 12 °C su patogenicidad disminuye acorde al tiempo de almacenamiento, al contrario de las temperaturas de 20 y 27 °C que, aunque disminuyó significativamente a los 150 días, el porcentaje de patogenicidad que obtuvieron a los 120 días nos mostró que para su patogenicidad también disminuye con el tiempo.

Por lo tanto, las temperaturas si influye en su tiempo de almacenamiento, así como en su supervivencia y patogenicidad. Mostrando que de las tres temperaturas la de 12 °C es la óptima para almacenarlos a más de seis meses.

LITERATURA CITADA

- Akhurst, R. (1982). Antibiotic activity of *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes of the families Heterorhabditidae and Steinernematidae. *Journal of General Microbiology*, 128, 3061–3065.
- Andaló, V., Moino, A., Maximiniano, C., Campos, V., y Mendonça, L. (2011). Influence of temperature and duration of storage on the lipid reserves of entomopathogenic nematodes. *Revista Colombiana de Entomologia*, 37(2), 203–209.
- Boemare, N. (2002). Biology, taxonomy and systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In *Entomopathogenic nematology* (CAB Intern).
- Boemare, N., y Akhurst, R. (1998). Biochemical and Physiological Characterization of Colony Form Variants in *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae). *Journal of General Microbiology, Australia*, 134(1), 751–761.
- Campbell, J., y Gaugler, R. (1993). *Nictation Behaviour and Its Ecological Implications in the Host Search Strategies of Entomopathogenic Nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae)*. 126(3/4), 155–169.
- Castro, I., Caspeta, J., Suarez, R., Peña, G., Ramirez, J., Cruz, K., Arenas, I., y Hernandez, V. (2020). *Oscheius myriophila* (Nematoda: Rhabditida) isolated in sugar cane soils in Mexico with potential to be used as entomopathogenic nematode. *Journal of Nematology*, 52(1), 1–8.
- Cruz, K. (2015). *Aislamiento y caracterización de las bacterias simbiotas de los nematodos entomopatógenos Heterorhabditidoides chongmingensis, Oscheius myriophila y Caenorhabditis brenneri*. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- 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.

- Dunphy, C., y Thurston, G. (1990). *Insect immunity*. In: Gaugler, R: Kaya. HK. Eds. *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. CRC Press. Boca Raton.
- Ghavamabad, R. G., Talebi, A. A., Mehrabadi, M., Farashiani, M. E., y Pedram, M. (2021). First record of *Oscheius myriophilus* (Poinar, 1986) (Rhabditida: Rhabditidae) from Iran; and its efficacy against two economic forest trees pests, *Cydalima perspectalis* (Walker, 1859) (Lepidoptera: Crambidae) and *Hyphantria cunea* (Drury, 1773) (Lepidopter. *Journal of Nematology*, 53, 1–16. <https://doi.org/10.21307/jofnem-2021-035>
- Grewal, P. (2000). Anhydrobiotic potential and long-term storage of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae). *International Journal for Parasitology*, 30(9), 995–1000.
- Guadarrama, M. (2015). *Respuesta de tres cepas de nematodos entomopatógenos expuestos a agroquímicos sobre Diatraea magnifactella*. Tesis para obtener el grado de Ingeniero en Biotecnología. Universidad Politécnica del Estado de Morelos.
- Hatab, M., y Gaugler, R. (1999). Lípidos de cultivos in vitro Heterorhabditis bacteriophora. *Control Biológico*, 15(3), 113–118.
- Jagdale, G. B., y Grewal, P. S. (2003). *Aclimatación de nematodos entomopatógenos a nuevas temperaturas : Acumulación de trehalosa y adquisición de termotolerancia* . 33, 145–152.
- Kaya, H. (1990). *Soil ecology*. En: *Entomopathogenic nematodes in biological control*. R. Gaugler and H. K. Kaya (Eds.). CRC Press, Boca Raton. 1(1), 93–115.
- Kaya, H., y Gaugler, R. (1993). *Entomopathogenic nematodes*, *Annual Reviews in Entomology*, 38. 1(1), 181–206.
- Kaya, H., y Stock, S. (1997). *Techniques in insect nematology. Manual of techniques in insect pathology*. Lawrence Lacey. Eds. Academic Press, Inc. San Diego, 281-324.

- Koppenhofer, M., y Fuzy, E. (2006). Effect of soil type on infectivity and persistence of the entomopathogenic nematodes *Steinernema scarabai*, *Steinernema glaseri*, *Heterorhabditis zealandica* and *Heterorhabditis bacteriophora*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 92(1), 11–22.
- MOLINEUX A. C. 1985. Survival of infective juveniles of *Heterorhabditis spp* and *Steinernema spp* (Nematoda: Rhabditida) at varies temperatures and their subsequent infectivity for insects. *Review Nematology* 8: 165
- Molina, J., Moino, A., Cavalcanti, R., Andaló, V., y Mendonça, L. (2006). Efecto de temperatura, concentración y tiempo de almacenamiento en la supervivencia de nematodos entomopatógenos. *Revista Colombiana de Entomologia*, 32(1), 24–30.
- Nguyen, K., y Smart Jr, G. (1996). Identification of Entomopathogenic Nematodes in the Steinernematidae and Heterorhabditidae (Nemata: Rhabditida). *Journal of Nematology*, 28(3), 286-300.
- Poinar Jr, G. (1976). Description and biology of a new insect parasitic rhabditoid, *Heterorhabditis bacteriophora* n.gen., n.sp. (Rhabditida; Heterorhabditidae n.fam.). *Nematologica*, 21(1), 463-470.
- Poinar Jr, G. (1993). Origins and phylogenetic relationships of the entomophilic rhabditids, *Heterorhabditis* and *Steinernema*. *Fundamental and Applied Nematology*, 16(4), 333–338.
- Poinar Jr, G., Thomas, G., Haygood, M., y Neelson, K. (1980). Growth and luminescence of the symbiotic bacteria associated with the terrestrial nematode, *Heterorhabditis bacteriophora*. *Soil Biology and Biochemistry*, 12(1), 5–10.
- Segal, D., y Glazer, I. (2000). Genetics for improving biological control agents: The case of entomopathogenic nematodes. *Crop Protection*, 19(8–10), 685–689. h
- Selvan, S., Glauger, R., y Lewis, E. (1933). Reservas bioquímicas de energia de nematodos

entomopat6genos. *Parasitol*, 79(1), 167–172.

Stock, P. (2015). Diversity, biology and evolutionary relationships. In *Nematode Pathogenesis of Insects and Other Pests* (pp. 3–23).

Thomas, G., y Poinar Jr, G. (1979). *Xenorhabdus* gen.nov., a genus of entomopathogenic, nematophilic bacteria of the family Enterobacteriaceae. *International Journal of Systematic Microbiology*, 29(1), 352–360.

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

Wright, D. J., y Perry, R. N. (2002). Physiology and biochemistry. Entomopathogenic nematology. CAB International, Wallingford, UK, 145-168.

Zhou, G., Yang, H., Wang, F., Bao, H., Wang, G., Hou, X., Lin, J., Yedid, G., y Zhang, K. (2017). *Oscheius microvilli* n. Sp. (Nematoda: Rhabditidae): A facultatively pathogenic nematode from Chongming Island, China. *Journal of Nematology*, 49(1), 33–41.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Licenciatura en Biología

Programa Educativo de Calidad *Acreditado* por el CACEB 2018-2023

Cuernavaca, Morelos a 28 de abril de 2023

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES
P R E S E N T E.

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: **THANIA GISEL RODRÍGUEZ OCAMPO**, con el título del trabajo: **CONSERVACIÓN DEL NEMÁTODO ENTOMOPATÓGENO *Oscheius myriophila* EN CUATRO DIFERENTES TEMPERATURAS.**

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación por Tesis como lo marca el artículo 6° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

A T E N T A M E N T E
Por una humanidad culta

JURADO REVISOR

FIRMA

PRESIDENTE: DR. EDGAR MARTÍNEZ FERNÁNDEZ

SECRETARIO: DR. JUAN MANUEL CASPETA MANDUJANO

VOCAL: DR. VICTOR MANUEL HERNÁNDEZ VELÁZQUEZ

SUPLENTE: DR. GUADALUPE PEÑA CHORA

SUPLENTE: DRA. MARY CARMEN TORRES QUINTERO

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

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

Sello electrónico

VICTOR MANUEL HERNANDEZ VELAZQUEZ | Fecha:2023-04-28 13:25:26 | Firmante

euwB9Z2nzaROmm9+RTWoVoldKli5ioEFdPmkh+9vQ5R8P4XkAyTegYPslSS+n84PGCQp0t+W2NqdWL45Jq0z00EP/gl01hQUEBzv0m9tkFLSu+IRbfyTOAilKi/k7zT9Sjnd0KSE
oRbyRkZ3fZL5fOD63JxcSAYUWG43ciClqYnVV6CEJPhXgk5k3B8qqeMGIcMeDiyajXPAQ+BdWZ4+r5rcly2C/Fo5fvykNfbc74vMvKQKEpSCfg4Yn6W4awyytFAd/E2bzJ7PBy
eabzBVkF3iKXRFjwAZZlowKu5UQSFP5MMRLxSp7DvHvB9E7IEky3z7xkeQifuAqVCMg==

GUADALUPE PEÑA CHORA | Fecha:2023-04-28 13:36:47 | Firmante

pAe55CmfkpUgQFms70InaOO3Xuu9Mj9fDU1FGCFTyPQC5UvIwZKRQKII4mFKzEwFdSRJeaZwCvSWMADOSIZzeyPvocrf/m5Ihvb2EMu6H5WN7YVHvFy0fprnkPe/ykShOynZ
XKVP9JHY4E8hABJsu44NYspv7glUPviAI9S75JnPkWwo+qjjZYeB/1ll/J9ywlI5yUCjKUIITNgeYOTxcepSI/FCPMwEs5wbPn8r5fwtz9L8TQTNXgBi7w1N2yt/K+143Mwf3HwCrqsZ1
eNfYQIX/KkYjG1VLFlu+kUJ54AgHDO2tyy/DW/x8d4HVwPANyw3hRrcQv6qJUPOHXDw==

EDGAR MARTINEZ FERNANDEZ | Fecha:2023-04-29 10:48:43 | Firmante

DY25D90HmNEBYUhlaxXhHxq3vFLyPRLARUDMF+eskDxoYiftWTdvt1vuDaAVgEsAGxPmKwyBaQjcrhCitq9JEo+L4S41Nbw9HM7RPKarUaUbTR6CA/IAB/cNje8bZVuZct+
GcHTPhWLJx+YITC7QwTasmhAgmLMXgzPCrTYCUtg7s3kRGZ288AQ+q7EYHKETQoFTZwJ9+8mU0BdOXI+9pJbJm5UT16ijCsNX33Foc2Jj+Deo44UYZ4oWsd3klwgm7c0BYi
EWR0775PaDkpV3Y3+NTv0hYYuzdhBYOTx2XKhJVw/7TnUr6bO6HKVPjkamgtR9siM3M8DLrpOeUQ==

JUAN MANUEL CASPETA MANDUJANO | Fecha:2023-04-29 20:37:36 | Firmante

E8hrmmi6KBdT05UziT1C6bOYVxlvAkO68d1EwNmA3PUaQQJSAY4cuiPQtv0fGQbkctNdzIL3lz2MDI4TdkOqM/PXZwXw59dL6Dtx7lvQt2IT+1xfORJp2iA8XTCGIpscqHOCcLIPF
pXk8Os+xO+xtBopvRAO75qz/FE1tJlySHpc2cM21qeYUJNNUI4zDte0d5WeGayx/Ckl9L SBu/SnVIO6VbNf/Lnx9KB9SLoo4lgQaWxmbyNBCfiAn6NdbfbcQUvEOHMy4fi1QVoP5I
s+v6IT7d7ale8wtqFgmBLMqYQZPeeUmfK+V4Kb/Jr95ffXaWHMqMR4QFc3uEq3o3bw==

MARY CARMEN TORRES QUINTERO | Fecha:2023-05-02 07:51:51 | Firmante

dIBMgiKslY5DCfcVgRkKmeZ+40J4875OEalFFzNxZ0EX+Z/9dU9toGR/I4jqS6uNEnBUOgTPs3lFXgfEynDRxmuDi3lhr7HBki8m9W3hxbv3Tu6kP7B3xuBSy7/yhVHkr8H6gA2VIO
csppoGbt45yq4n2SGK/duHSKn2Vxik7VcRMVqk9pBNPyUrUoJj5dWwVAsuXjDadAVzmlwTZHpTkDoEhcjDHU9UNk7sPZJB4cj1tyTJjw+smSUjivwqXPSgnrVgq2GsAjmGyTZcnm
E9ekRW50krbiWRtzCxnD0CvGw/zmu69J5EsrIF0zwHOVCszY4UC2KtkXUs9qWhFUA==

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



HbsJXoZwc

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/reSIERYzFTBrL0yDAPkxHQ4rU1EJH41c>