



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**INTERACCIONES BACTERIANAS DE CEPAS AISLADAS DE TRES
ESPECIES DE NEMÁTODOS ENTOMOPATÓGENOS
EVALUADAS EN *Spodoptera frugiperda*.**

TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L Ó G O

P R E S E N T A:

YARELI JAIME MALDONADO

DR. VICTOR MANUEL HERNÁNDEZ VELÁZQUEZ

DIRECTOR DE TESIS

M. EN C. LAURA PATRICIA LINA GARCÍA

CO-DIRECTOR DE TESIS

CUERNAVACA, MORELOS

JUNIO, 2022

Índice

1. Introducción.....	6
2. Antecedentes.....	7
2.1 Nemátodos entomopatógenos	7
2.1.1 Familia Heterorhabditidae	8
2.1.2 Familia Steinernematidae	9
2.1.3 Nemátodos nativos del estado de Morelos	11
2.1.4 Interacción bacteria-nemátodo	11
2.2 Bacterias entomopatógenas	13
2.2.1 Género <i>Bacillus</i>	14
2.2.2 Mecanismo de acción de <i>Bacillus thuringiensis</i>	14
2.2.3 Género <i>Serratia</i>	16
2.2.4 Mecanismo de acción de <i>Serratia marcescens</i>	16
2.2.5 Cepas aisladas de Nemátodos nativos del estado de Morelos	18
2.3 Interacciones bacterianas	18
2.3.1 Sinergismo	18
2.3.2 Antagonismo	19
2.3.3 Aditividad	19
2.4 <i>Spodoptera frugiperda</i> como plaga.....	19
2.4.1 Ciclo de vida de <i>S. frugiperda</i>	20
2.4.2 Control biológico de <i>S. frugiperda</i>	21
3. Justificación	22
4. Hipótesis	23
5. Objetivo General	23
6. Objetivos particulares	23
7. Materiales y Métodos	24
7.1 Ubicación del estudio	24
7.2 Material Biológico	24
7.3 Recuperación de las cepas bacterianas MC5-R, DS-R y DS-B.....	24
7.4 Obtención de colonias puras.....	25
7.5 Pruebas de inhibición entre bacterias en medio sólido	25
7.6 Evaluación de patogenicidad de las interacciones bacterianas en <i>S. frugiperda</i>	26
7.6.1 Bioensayos de patogenicidad por alimentación	26

7.6.2 Bioensayos de patogenicidad por inyección	27
7.7 Determinación de las interacciones sinergismo, antagonismo y aditividad sobre <i>S. frugiperda</i>	28
8. Resultados	28
8.1 Pruebas de inhibición entre bacterias en medio sólido	28
8.2 Evaluación de patogenicidad de las interacciones bacterianas en <i>S. frugiperda</i>	29
8.2.1 Bioensayos de patogenicidad por alimentación	29
8.2.1.1 Determinación de las interacciones sobre <i>S. frugiperda</i>	31
8.2.2 Bioensayos de patogenicidad por inyección	32
8.2.2.1 Determinación de las interacciones sobre <i>S. frugiperda</i>	36
9. Discusión.....	38
10. Conclusiones.....	41
11. Perspectivas	41
12. Glosario	42
13. Literatura	44

Índice de figuras

Figura 1. Los nemátodos son organismos en forma de gusanos redondos	7
Figura 2. Nemátodo mostrando poro excretor (A) y campos laterales (B)	8
Figura 3. Diente dorsal (A) de los infectivos juveniles de la familia Heterorhabditidae ayuda a penetrar al interior del insecto hospedero por las membranas inter segmentales.....	9
Figura 4. Interacción bacteria-nemátodo	12
Figura 5. Mecanismo de acción de <i>B. thuringiensis</i> modificada de	15
Figura 6. Sistema quitinolítico de <i>S. marcescens</i>	17
Figura 7. Representación esquemática del mecanismo de acción de las proteínas Cry	18
Figura 8. Ciclo biológico de <i>S. frugiperda</i>	21
Figura 9. Técnica de estriada cruzada.	25
Figura 10. Representación del método de las pruebas de inhibición en medio sólido.	26
Figura 11. Porcentaje de mortalidad \pm Desviación Estándar de los bioensayos de patogenicidad por alimentación con una dosis de 1.2×10^4 células/ml.	31
Figura 12. Tratamiento con XRPC4-2 en donde se observan larvas vivas que no crecieron de forma uniforme.	31
Figura 13. Larvas de los bioensayos por inyección a las 24 hrs	33
Figura 14. Larvas vivas de los bioensayos de patogenicidad por inyección a las 48 horas	34
Figura 15. Larvas muertas de los bioensayos de patogenicidad por inyección a las 48 horas	35
Figura 16. Porcentaje de mortalidad \pm Desviación Estándar de los bioensayos de patogenicidad por inyección a las 24 y 48 horas a una dosis de 0.5×10^2 células/ml.	36

Índice de cuadros

Cuadro 1. Especies de <i>Heterorhabditis</i> y sus respectivas bacterias simbióticas	9
Cuadro 2. Nemátodos Entomopatógenos y su bacteria simbiote modificado	10
Cuadro 3. Medio LB líquido	24
Cuadro 4. Combinaciones de cepas para las evaluaciones de las interacciones.	26
Cuadro 5. Resultados de las pruebas de inhibición entre las cepas bacterianas. Las cepas entre * son las cepas que se sembraron de forma masiva. *	29
Cuadro 6. Interacciones de los bioensayos de alimentación.	32
Cuadro 7. Interacciones de los bioensayos por inyección a las 24 horas.	37

1. Introducción

Los nemátodos han convivido con insectos por millones de años, produciéndose todo tipo de relaciones que van desde las beneficiosas para los insectos, hasta las perjudiciales como son los parasitismos y patogénesis. La adaptación de los Nemátodos Entomopatógenos (NEPs) para utilizar a los insectos como substratos de alimentación, para su dispersión y propagación, son características que han permitido su uso para el control biológico de insectos plagas. El estudio de este tipo de control ha permitido la selección de cepas que pueden ejercer controles efectivos y en condiciones en donde otras sistemas técnicas de control no son posibles o son menos efectivas (France *et al.*, 2013).

Las especies de nemátodos entomopatógenos que han mostrado mejores resultados en el control biológico de plagas pertenecen a las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae. Estas familias presentan simbiosis con bacterias que le proporcionan una ventaja infectiva a los Nemátodos (Kaya & Gaugler, 1993). La familia Heterorhabditidae está asociada a diferentes géneros bacterianos como *Bacillus* y *Serratia*. Estas bacterias entomopatógenas son capaces de entrar al hospedero utilizando al nemátodo como vehículo, para después proliferar y multiplicarse, causando enfermedad, cuya infección está mediada por factores de patogenicidad como toxinas y enzimas producida por la bacteria generalmente (Jurat & Jackson, 2012).

Las interacciones bacterianas o microbianas son importantes y útiles para el descubrimiento de productos naturales biológicamente activos y especies microbianas que permitan mejorar la protección de cultivos, así como para entender su significado ecológico y su diversidad, las más estudiadas son sinergismo y antagonismo. El sinergismo es la acción de dos microorganismos capaces de producir un efecto bactericida superior al ejercido cada uno por separado. Mientras que el antagonismo es la interacción de dos microorganismos capaces de producir un efecto bactericida inferior al ejercido por separado (De La Fuente *et al.*, 2015).

El objetivo de esta investigación es determinar el tipo de interacción bacteriana de las cepas de los géneros *Serratia* y *Bacillus* aisladas de los nemátodos MC5 (*Oscheius myriophila*), DS (*Caenorhabditis brenneri*) y XRPC4 (*Hererorhabditidoides sp.*), e identificar el tipo de interacción (sinergismo, antagonismo o aditividad) que entre si presentan para finalmente evaluar la patogenicidad de las interacciones bacterianas en *Spodoptera frugiperda*. Esta investigación complementará los estudios sobre las cepas bacterianas de Nemátodos entomopatógenos, permitiendo el desarrollo de nuevos métodos más efectivos para el control biológico de plagas.

2. Antecedentes

2.1 Nemátodos entomopatógenos

Los nemátodos son organismos en forma de gusanos redondos, no segmentados (Figura 1) que tienen diferentes “estilos de vida”, incluyendo los de vida-libre, los predadores y los parásitos. La biodiversidad de estos organismos es extensa, existen cerca de 40 familias asociadas con insectos (Cubillas & Flores, 2016).



Figura 1. Los nemátodos son organismos en forma de gusanos redondos (Fimbres & Flores, 2016).

Los NEPs deben su actividad a su asociación con una o más especies de bacterias, dentro de estos los que han mostrado mejores resultados en el control biológico de plagas pertenecen a las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae. Los steinernemátidos y heterorhabdítidos en la naturaleza son patógenos obligados, es decir, son microorganismos causantes de enfermedades que requieren de un hospedero vivo para crecer y reproducirse, el cual muere como resultado de la infección; aunque son patógenos obligados tienen una etapa de vida libre en la que el nemátodo no se alimenta, conocida como juvenil infectivo (JI), o J3, que es el que busca e infecta los insectos hospederos en el suelo. El JI ingresa al hospedero a través de aberturas naturales como son boca, espiráculos y ano; en el caso de los heterorhabdítidos también pueden ingresar por áreas delgadas de la cutícula (Kaya & Gaugler, 1993).

2.1.1 Familia Heterorhabditidae

Los miembros de esta familia (Cuadro 1) son parásitos obligados de insectos, los JIs transportan la bacteria simbiótica *Photorhabdus spp.* El poro excretor se localiza posterior al anillo nervioso (Figura 2).

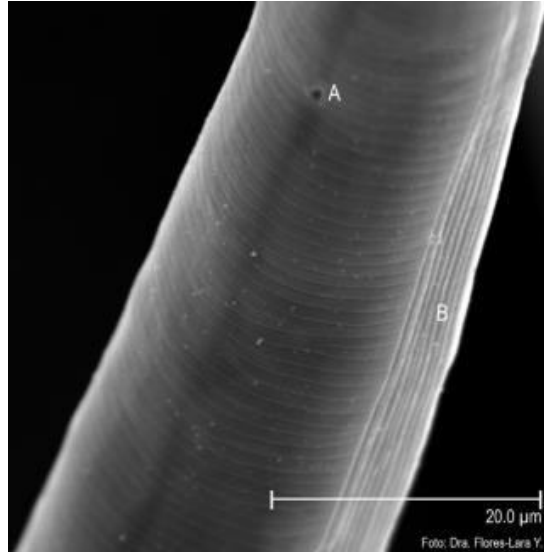


Figura 2. Nemátodo mostrando poro excretor (A) y campos laterales (B) (Fimbres & Flores, 2016).

Las hembras hermafroditas o adultos de primera generación presentan una cabeza trunca, seis labios cónicos bien desarrollados, estoma ancho, poro excretor usualmente posterior al final del esófago, ovotestis amfidélfico reflejado. Las hembras amfimícticas o adultos de segunda generación son más chicas que las hembras hermafroditas, presentan papila labial prominente, sistema reproductivo amfidélfico. Los machos presentan un testículo reflejado, cabeza de la espícula corta, presentan bursa con nueve pares de papilas genitales. El juvenil infectivo del tercer estadio normalmente mantiene la cutícula del segundo estadio juvenil ya que el estado pre-infectivo no muda, especialmente si no hay suficientes nutrientes; de manera que el JI presenta una doble cutícula, la cual lo protege de factores ambientales adversos y aumenta su virulencia, la cabeza presenta diente dorsal prominente, la cutícula es estriada (De-Jun *et al.*, 2001; Nguyen & Smart, 1996). El diente dorsal les ayuda a penetrar al interior del insecto hospedero por las membranas inter segmentales (Figura 3) (Stuart & Gaugler, 1994).

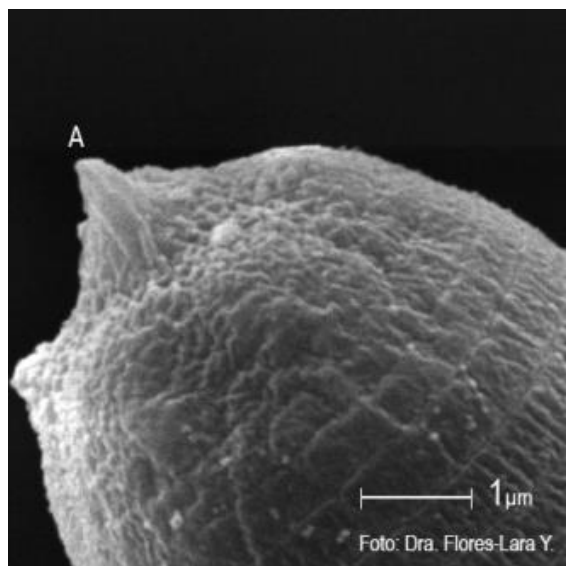


Figura 3. Diente dorsal (A) de los infectivos juveniles de la familia Heterorhabditidae ayuda a penetrar al interior del insecto hospedero por las membranas inter segmentales (Fimbres & Flores, 2016).

Cuadro 1. Especies de *Heterorhabditis* y sus respectivas bacterias simbióticas Modificado de (Kaya & Gaugler, 1993).

Género de nemátodo	Especie de nemátodo	Especie simbiote
<i>Heterorhabditis</i>	<i>H. baujardi</i>	Sin describir
<i>Heterorhabditis</i>	<i>H. brevicaudis</i>	<i>P. luminescens</i>
<i>Heterorhabditis</i>	<i>H. downesi</i>	<i>Photorhabdus sp.</i>
<i>Heterorhabditis</i>	<i>H. indica(hawaiiensis)</i>	<i>P. luminescens</i>
<i>Heterorhabditis</i>	<i>H. marelata(hepiallius)</i>	<i>P. luminescens</i>
<i>Heterorhabditis</i>	<i>H. meigidis</i>	<i>P. temperata</i>
<i>Heterorhabditis</i>	<i>H. poinari</i>	<i>Photorhabdus sp.</i>
<i>Heterorhabditis</i>	<i>H. taysearae</i>	Sin describir
<i>Heterorhabditis</i>	<i>H. zealandica</i>	<i>P. temperata</i>
<i>Heterorhabditis</i>	<i>H. bacteriophora</i>	<i>P.luminescens</i>

2.1.2 Familia Steinernematidae

Todas las especies son sexuales; por esto los steinernemátidos requieren de un JI hembra y uno macho para invadir un insecto hospedero y producir progenie. Las especies de nemátodos están asociadas con una especie específica de bacteria simbiótica, pero las bacterianas pueden estar

asociadas con más de una especie de nemátodo (Cuadro 2), como es el caso del género *Xenorhabdus*, cinco especies están asociadas con *Steinernema* (Fischer *et al.*, 1999).

Cuadro 2. Nemátodos Entomopatógenos y su bacteria simbionte modificado de (Akhurst & Boemare, 1990).

Género de nemátodo	Especie de nemátodo	Especie simbionte
<i>Steinernema</i>	<i>S. abbasi</i>	Sin describir
<i>Steinernema</i>	<i>S. affine</i>	<i>Xenorhabdus bovienii</i>
<i>Steinernema</i>	<i>S. anatoliense</i>	Sin describir
<i>Steinernema</i>	<i>S. arenarium(anomali)</i>	<i>Xenorhabdus sp.</i>
<i>Steinernema</i>	<i>S. asiaticum</i>	Sin describir
<i>Steinernema</i>	<i>S. bicornutum</i>	Sin describir
<i>Steinernema</i>	<i>S. carpocapsae</i>	<i>X. nematophila</i>
<i>Steinernema</i>	<i>S. caudatum</i>	Sin describir
<i>Steinernema</i>	<i>S. ceratophorum</i>	Sin describir
<i>Steinernema</i>	<i>S. cubanum</i>	<i>X. poinarii</i>
<i>Steinernema</i>	<i>S. diaprepesi</i>	Sin describir
<i>Steinernema</i>	<i>S. feltiae</i>	<i>X. bovienii</i>
<i>Steinernema</i>	<i>S. glaseri</i>	<i>X. poinarii</i>
<i>Steinernema</i>	<i>S. intermedium</i>	<i>X. bovienii</i>
<i>Steinernema</i>	<i>S. kari</i>	Sin describir
<i>Steinernema</i>	<i>S. kraussei</i>	<i>X. bovienii</i>
<i>Steinernema</i>	<i>S. kushidai</i>	<i>X. japónica</i>
<i>Steinernema</i>	<i>S. loci</i>	Sin describir
<i>Steinernema</i>	<i>S. longicaudum</i>	Sin describir
<i>Steinernema</i>	<i>S. monticolum</i>	Sin describir
<i>Steinernema</i>	<i>S. neocurtillae</i>	Sin describir
<i>Steinernema</i>	<i>S. oregonense</i>	Sin describir
<i>Steinernema</i>	<i>S. puertoricense</i>	Sin describir
<i>Steinernema</i>	<i>S. rarum</i>	<i>Xenorhabdus sp.</i>
<i>Steinernema</i>	<i>S. riobrave</i>	<i>Xenorhabdus sp.</i>
<i>Steinernema</i>	<i>S. ritteri</i>	<i>Xenorhabdus sp.</i>
<i>Steinernema</i>	<i>S. sangi</i>	Sin describir
<i>Steinernema</i>	<i>S. scapterisci</i>	<i>Xenorhabdus sp.</i>
<i>Steinernema</i>	<i>S. scarabaei</i>	Sin describir
<i>Steinernema</i>	<i>S. siamkayai</i>	<i>Xenorhabdus sp.</i>
<i>Steinernema</i>	<i>S. tami</i>	<i>Xenorhabdus sp.</i>

<i>Steinernema</i>	<i>S. thanhi</i>	Sin describir
<i>Steinernema</i>	<i>S. thermophilum</i>	Sin describir
<i>Steinernema</i>	<i>S. websteri</i>	Sin describir
<i>Steinernema</i>	<i>S. wesieri</i>	Sin describir
<i>Steinernema</i>	sin describir	<i>X. beddingii</i>
Por confirmar	<i>S. serratum</i>	<i>Sin describir</i>

2.1.3 Nemátodos nativos del estado de Morelos

En los últimos años se han aislado y identificado varias especies de nemátodos, en el laboratorio de Control Biológico del Centro de Investigación en Biotecnología, Castro (2014) aisló nemátodos entomopatógenos en cultivos de caña de azúcar, los cuales se identificaron como *Oscheius myriophila* (MC5) y *Caenorhabditis brenneri* (DS). MC5 fue aislado de muestras de suelo franco arenoso en Tepalcingo, Morelos; mientras que DS fue aislado directamente de una larva de *Diatraea magnifactella* (Cruz, 2018). Por otro lado, en 2018 se aisló del suelo de caña de azúcar en Real del puente Xochitepec, Morelos el nemátodo XRPC4 identificado como *Heterorhabditoides sp.* (Castro, 2020).

2.1.4 Interacción bacteria-nemátodo

Como se mencionó anteriormente, los nemátodos establecen una simbiosis con bacterias de la familia Enterobacteriaceae presentes en su tracto intestinal. Así, *Steinernematidae* se asocia principalmente con bacterias del género *Xenorhabdus* y *Heterorhabditidae* con bacterias del género *Photorhabdus*, aunque la bacteria puede estar asociada con más de una especie de nemátodo (Goodrich & Clarke, 2007; Rodríguez, 2019). Una vez que el JI encuentra un insecto susceptible, lo penetra y llega al hemocele, libera sus bacterias simbiotas (Figura 4), estas producen sustancias bioactivas que inhiben el sistema inmune y digieren los tejidos del hospedero, al reproducirse sirven como fuente de alimento para el crecimiento y desarrollo del nemátodo; así mismo producen antibióticos que evitan que otros microorganismos colonicen el cadáver. Los nemátodos continúan reproduciéndose dentro del insecto pudiendo completar varios ciclos de vida, matan al insecto hospedero en 48 horas por septicemia. Una vez que el alimento se termina se forman nuevamente los juveniles infectivos que salen de la larva y migran al suelo en busca de otros hospederos (Goodrich & Clarke, 2007; Kaya & Gaugler, 1993; Uribe *et al.*, 2005).

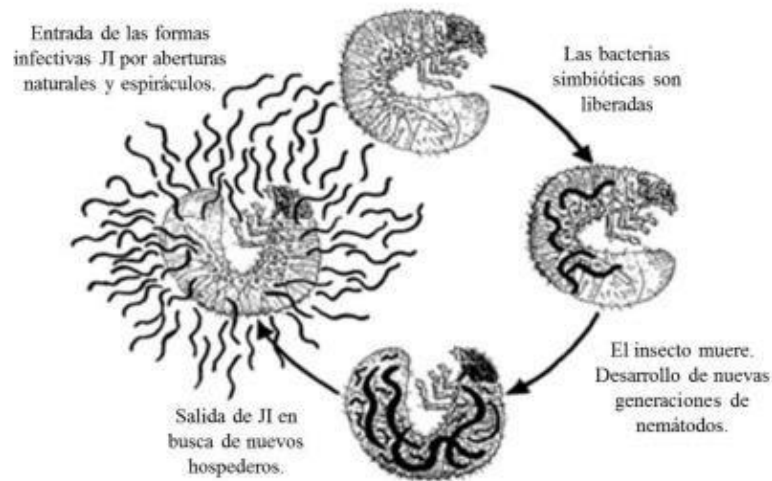


Figura 4. Interacción bacteria-nemátodo (Cruz, 2018).

La relación entre el nemátodo y la bacteria es importante, ya que el nemátodo emplea a la bacteria como ayuda para superar las defensas humorales y celulares del hospedero, como sustrato para su crecimiento y su reproducción y para proteger al cadáver del insecto contra microorganismos saprofitos, mientras que las bacterias a su vez lo utilizan como vector para su liberación en el hemocele del insecto y poder nutrirse de éste, así como para persistir fuera del mismo. Esta asociación mutualista favorece el desarrollo, la multiplicación del nemátodo y la infectividad de los JI, ya que aquellos que carezcan de la bacteria simbiote suelen no causar la muerte, o si la causan, no crecen ni se reproducen (Grewal *et al.*, 1997; Han & Ehlers, 1998; Poinar *et al.*, 1977; Poinar & Thomas, 1966).

Los steinernemátidos y heterorhabdítidos están mutualísticamente asociados con bacterias que ocasionan septicemia, la cual es una condición mórbida causada por la invasión y multiplicación de microorganismos, causando afecciones letales en sus hospederos. Dentro de las características que hacen de éste un grupo promisorio de controladores biológicos pueden destacarse las siguientes: alta virulencia y rápida acción al matar al hospedero. El tercer estadio juvenil infectivo no se alimenta, está morfológica y fisiológicamente adaptado para sobrevivir por largos períodos en el suelo en ausencia de su hospedero, tienen alto potencial reproductivo y muestran respuesta numérica con respecto al hospedero. Tienden a criarse de forma masiva en laboratorio, tienen un amplio rango de acción, aunque algunos son muy poco específicos (Cubillas & Flores, 2016).

De manera adicional, presentan alta resistencia a productos químicos y a condiciones ambientales adversas, tanto los NEPs como sus bacterias, son inocuos para humanos y animales domésticos, no causan ningún daño a las plantas por ser específicos para insectos. (Sáenz, 2005).

El éxito del control biológico basado en el uso de los NEPs puede depender de que estos posean ciertas características benéficas, como la virulencia, el potencial reproductivo y la tolerancia al medio ambiente. Dichas características pueden variar significativamente incluso entre cepas de la misma especie. Los NEPs pueden ser aplicados en estadio de juvenil infectivo en conjunción con algunos otros plaguicidas biológicos y/o químicos, fertilizantes, mejoradores del suelo y frecuentemente es más económico mezclarlos con estos insumos para su aplicación. Los NEPs han sido usados principalmente como agentes de control biológico en el suelo, pero existen reportes sobre aplicaciones foliares de NEPs con *S. feltiae* que han sido exitosas para controlar el gusano minador *Liriomyza huidobrensis* en lechuga de invernadero (Cuthbertson *et al.*, 2003).

2.2 Bacterias entomopatógenas

Las bacterias entomopatógenas son capaces de entrar al hospedero y evadir sus defensas para proliferar y multiplicarse, causando enfermedad mediada por factores de patogenicidad como toxinas y enzimas. Tras causar la muerte del insecto, la nueva progenie de las bacterias sale para infectar nuevos hospederos. En algunos casos, como *Bacillus* sp., las bacterias esporulan produciendo un estado de vida resistente a factores ambientales, lo que les da una gran ventaja al considerar la limitada disponibilidad de hospederos viables y la dispersión pasiva de las bacterias entomopatógenas (Jurat & Jackson, 2012).

Las bacterias entomopatógenas principales pertenecen a los géneros *Bacillus*, *Peanibacillus*, *Brevibacillus*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* (Sajnaga & Kazimierczak, 2020).

Los nemátodos como *O. chongmingensis* tienen relación simbiótica con bacterias de los géneros *Ochrobactrum*, *Bacillus*, *Albidiferax*, *Acinetobacter* y *Rhodococcus* (Fu & Liu, 2019).

Una de las bacterias más utilizadas como agente de control biológico entomopatógeno es *B. thuringiensis* ya que se considera que está muy extendida en el suelo y es un patógeno letal para diversos géneros (Kalha *et al.*, 2014).

2.2.1 Género *Bacillus*

Este género comprende una amplia diversidad, donde se destacan características como la degradación de la mayoría de los sustratos derivados de plantas y animales, incluyendo celulosa, almidón, pectina, proteínas, agar, hidrocarburos y otros; además su capacidad para la producción de antibióticos, la nitrificación, desnitrificación, fijación de nitrógeno, litotrofia facultativa, acidofilia, alcalofilia, psicofilia, termofilia y el parasitismo, ejemplifican su capacidad de sobrevivir en diversos ambientes. Los miembros de este género se caracterizan por ser Gram positivos, de forma bacilar, catalasa positiva, aerobios estrictos o anaerobios facultativos y la formación de endosporas termorresistentes a agentes perjudiciales como la desecación, la radiación, los ácidos grasos y los desinfectantes químicos, lo que les posibilita ocupar un lugar importante como agentes de control biológico. Su diversidad metabólica está asociada a la promoción del crecimiento vegetal y control de patógenos (Logan & Vos, 2015; Villarreal *et al.*, 2018).

Algunas especies son conocidas en el ámbito agrícola debido a su uso para el control de plagas, por ejemplo, *B. thuringiensis* (Bt) la cual sintetiza proteínas llamadas Cry las cuales son capaces de formar cristales y matar a diversos insectos susceptibles, ya que estos aseguran que al ser ingeridos por el insecto este reciba suficiente dosis para incapacitarlo y permitir la germinación de esporas de Bt (A. Ruiz *et al.*, 2003).

2.2.2 Mecanismo de acción de *Bacillus thuringiensis*

B. thuringiensis (Bt) sintetiza proteínas llamadas Cry, las cuales son capaces de formar cristales y aniquilar a diversos insectos susceptibles; Bt también sintetiza otras proteínas conocidas como Cyt y Vip que son insecticidas, y otros compuestos con probable uso biotecnológico (Sánchez *et al.*, 2003).

Las proteínas Cry son sintetizadas durante la esporulación como protoxinas que forman cristales, cuando un organismo susceptible ingiere los cristales estos son solubilizados en el intestino medio por el pH alcalino de este; la fracción resultante, llamada protoxina, es activada mediante enzimas para después unirse a receptores localizados en las microvellosidades de las células del epitelio intestinal. Posteriormente, la toxina o parte de esta se inserta en la membrana de las

células intestinales formando poros que provoca un desbalance osmótico hasta llegar a la lisis celular (Figura 5). Los primeros síntomas de la intoxicación son la casi inmediata parálisis de la motilidad intestinal y cese de la alimentación, una vez que atraviesan la barrera del intestino, las esporas germinan en el ambiente nutritivo del hemocele, la rápida proliferación de bacterias ocasiona septicemia y ocurre la muerte (León *et al.*, 2018; Miranda *et al.*, 2002; Sánchez *et al.*, 2003).

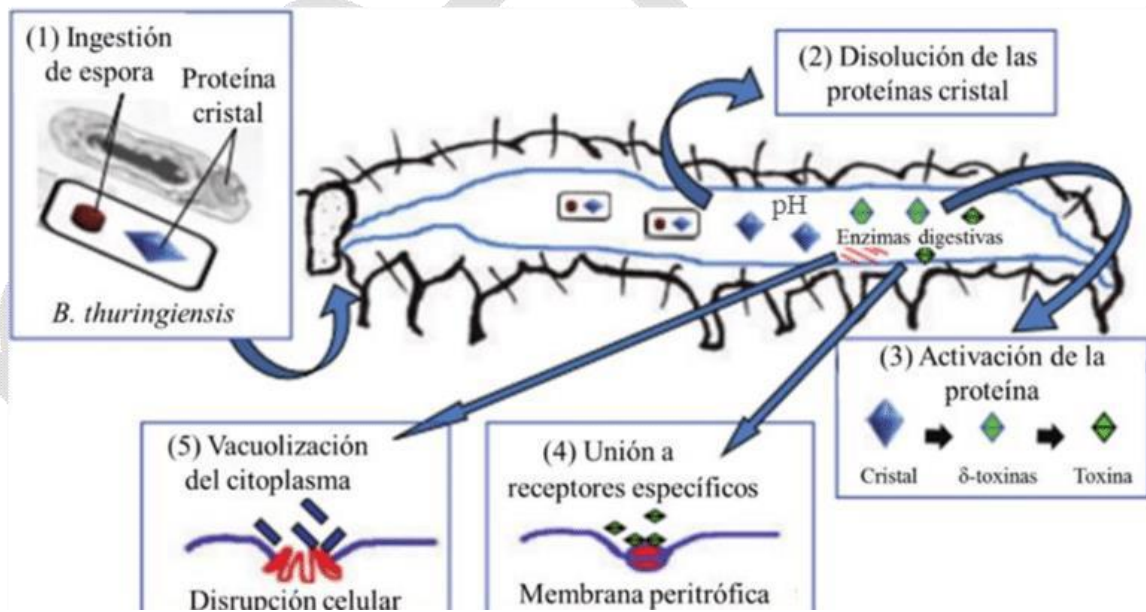


Figura 5. Mecanismo de acción de *B. thuringiensis* modificada de (Schünemann *et al.*, 2014).

2.2.3 Género *Serratia*

El género *Serratia* pertenece a la familia Enterobacteriaceae, integrada por bacilos Gram negativos cortos y rectos de 0.5-0.8µm de diámetro y 0.9-2.0µm de longitud, generalmente móviles por flagelos (Von Graevenitz y Rubin, 1980). Son anaerobios facultativos, oxidasa negativos, fermentan la glucosa y reducen el nitrato (Alonso, 2002).

Algunas especies como *S. marcescens* y *S. liquefaciens* infectan y causan mortalidad en insectos plaga de cultivos y ornamentales, en tanto que *S. entomophila* es utilizada como control biológico de la larva de *Costelytra zealandica*, depredador de los pastizales en Nueva Zelanda (Grimont & Grimont, 2005).

Una característica distintiva del género *Serratia* es que forma una aparente asociación con nemátodos del género *Caenorhabditis*, algunos de los más conocidos son *C. elegans* y *C. briggsae* (Petersen & Tisa, 2012).

2.2.4 Mecanismo de acción de *Serratia marcescens*

S. marcescens produce un pigmento rojo llamado prodigiosina, así como otros compuestos como lectinasas, fosforilasas, toxinas extracelulares y quitinasas.

Las quitinasas(Chi) son enzimas que hidrolizan la quitina en el enlace glicosídico y se pueden distinguir los siguientes tipos de quitinasas: endoquitinasas, exoquitinasas y quitobiasas; que se encargan de la degradación de la quitina de la membrana peritrófica del insecto, causando la lisis celular, posteriormente, se produce una proliferación en el hemocele causando septicemia hasta llegar a la muerte (Sánchez *et al.*, 2003).

En el sistema quitinolítico (Figura 6) de *S. marcescens* la quitina que se encuentra en el medio es degradada por una endoquitinasa (ChiA) que rompe los enlaces internos de la quitina formando oligómeros que pasan al espacio periplásmico gracias a la ayuda de la proteína porina que se encuentra en la pared celular de la bacteria; posteriormente, los oligómeros son degradados por una quitobiosidasa (ChiB), después la quitobiosa es hidrolizada por quitobiasas para formar monómeros de N-acetilglucosamina que pasaran al citoplasma con la ayuda de la proteína EII para ser usadas como fuentes de carbono y nitrógeno(Sánchez *et al.*, 2003).

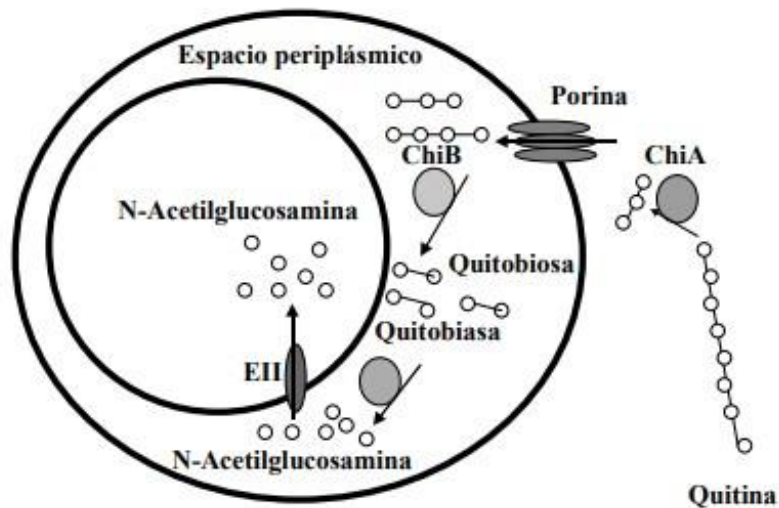


Figura 6. Sistema quitinolítico de *S. marcescens* (Sánchez *et al.*, 2003).

Las quitinasas de *S. marcescens* actúan en la membrana peritrófica de las larvas de los insectos, permitiendo que las proteínas Cry tengan un mayor acceso a los receptores del intestino medio, obteniéndose así una mayor capacidad insecticida, que si actuaran por sí solas (Figura 7). Esto es de particular importancia, especialmente para el caso de los insectos que son poco susceptibles a Cry (Sánchez *et al.*, 2003).

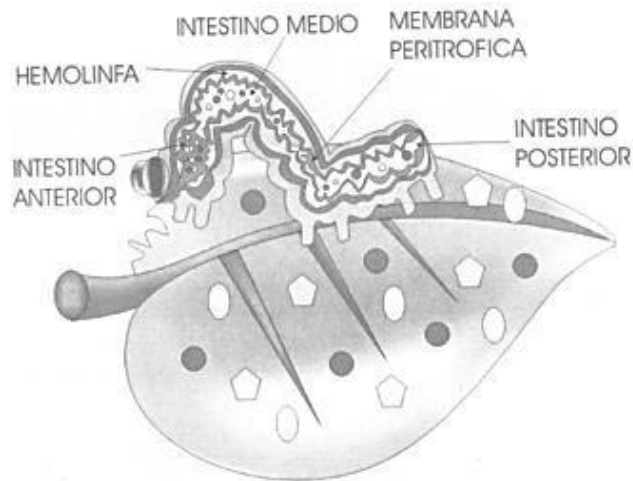




Figura 7. Representación esquemática del mecanismo de acción de las proteínas Cry () y el posible papel de las quitinasas () (Sánchez *et al.*, 2003).

2.2.5 Cepas aisladas de Nemátodos nativos del estado de Morelos

De los aislados del laboratorio de Control Biológico del Centro de Investigación en Biotecnología, se obtuvieron dos aislados de *O. myriophila* como MC5-R y MC5-B; dos aislados de *C. brenneri* como DS-R y DS-B, así como dos aislados de *Heterorhabditoides sp.* como XRPC4-1 y XRPC4-2. De acuerdo con su identificación molecular los aislados MC5-R y DS-R son del género *Serratia*, mientras que DS-B pertenece al género *Bacillus* (Cruz, 2018). Actualmente, se está trabajando en la identificación de los aislados XRPC4-1 y XRPC4-2 ya que solo se han hecho algunas pruebas.

En el 2018 Cruz evaluó la patogenicidad y virulencia de las bacterias simbioses sobre *G. mellonella* y *Tenebrio molitor*. La DL50 para los aislados MC5-R y DS-R fue <10 células/larva directamente inyectadas en el hemocele de *G. mellonella* por lo que son consideradas entomopatógenas y para el caso de *T. molitor* los aislados MC5-R y DS-R presentan una DL50 de 4694 y 7215.2 células/larva. Actualmente, se están realizando pruebas patogenicidad de los aislados bacterianos XRPC4-1 y XRPC4-2.

2.3 Interacciones bacterianas

En los ecosistemas coexisten una variedad de interrelaciones entre microorganismos de diferentes especies, dentro de estas se encuentran el sinergismo y antagonismo, en estas relaciones puede presentarse cooperación entre ellos o competencia física y bioquímica, estas relaciones se encuentran moduladas por múltiples y complejos factores bióticos y abióticos (Moreno, 2017).

2.3.1 Sinergismo

El sinergismo conlleva a la protooperación entre especies o dos poblaciones microbianas, indicando que ambas se benefician de la relación (Moreno, 2017).

Por ejemplo, se ha reportado a *B. thuringiensis aizawai* como sinergista de *X. sp* y *P. temperata* ya que forman una mezcla como tratamiento oral contra *S. exigua* (Jung & Kim, 2006a).

También se ha reportado a *B. thuringiensis aizawai* como sinergista de *X. nematophila* K1, bacteria simbiótica de un nemátodo estomopatógeno identificado como *S. carpocapsae*, la mezcla administrada de forma oral de estas bacterias mostró ser un tratamiento efectivo para *S. exigua* (Jung & Kim, 2006b).

Otro ejemplo es la mezcla de esporas-cristal de una cepa de *B. thuringiensis* subsp. *entomocidus* y bacterias quitinolíticas que mostraron un efecto sinérgico contra *S. littoralis* ya que con 3 µg/ml provocó un efecto tóxico equivalente a 20µg/ml de la mezcla esporas- cristal de la cepa *B. thuringiensis* subsp. *entomocidus* (Regev *et al.*, 1996).

2.3.2 Antagonismo

De acuerdo con lo anterior, el antagonismo microbiano está dado por la inhibición, deterioro o muerte de alguna especie de microorganismos por la acción de otra; o una relación entre dos poblaciones en la cual una de ellas causa efectos deletéreos o negativos a la otra (Moreno, 2017).

Algunas bacterias entomopatógenas como *B. polymyxa*, *B. thuringiensis*, *Pseudomonas fluorescens* y *S. marcescens* poseen actividad inhibidora contra varias bacterias (Ugras & Demirbag, 2013).

Por ejemplo, *Pantoea agglomerans* se mostró como antagonista sobre *B. cereus* en tratamiento contra jobotos *Phyllophaga sp.*, *Anomala sp.* y *Cyclocephala sp.* (Vargas & Abarca, 1998).

2.3.3 Aditividad

La aditividad se define como el efecto combinado resultante de la acción de dos o más microorganismos el cual es igual a la suma del efecto individual (Huff *et al.*, 1986).

2.4 *Spodoptera frugiperda* como plaga

El gusano cogollero *S. frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) es un insecto polífago y cosmopolita que ocasiona severos daños en diversos cultivos (Sparks, 1979), en maíz es la principal plaga que causa pérdidas superiores al 30 % (Hernández *et al.*, 2019). Además de ser plaga de otros cultivos de cereales y sorgos forrajeros, maní, algodón, soja, alfalfa y ocasionalmente otros cultivos (E. Ruiz *et al.*, 2013).

En México se considera una de las plagas más importantes del maíz y sorgo ya que se alimenta de las hojas y los tallos tiernos de las plantas, este insecto reduce el rendimiento del maíz hasta un 30% y en ocasiones causa pérdida total debido a que lo afecta en todos sus estados fenológicos (Castoreña & Catalàn, 2004; Rojas *et al.*, 2004). *S. frugiperda* tiene hábitos migratorios, pero también puede estar presente durante todo el año en la misma localidad, desarrollándose en cultivos alternos como alfalfa, arroz, algodón, etc. (Juárez *et al.*, 2010). Este es de los pocos insectos que se dispersan y reproducen a través de todo el continente americano, ha sido combatido en las últimas tres décadas principalmente con el uso de plaguicidas de amplio espectro, ocasionando así el desarrollo de resistencia a la mayoría de los productos químicos registrados (Esparza, 2017).

2.4.1 Ciclo de vida de *S. frugiperda*

Dependiendo de las temperaturas y la humedad, el ciclo completo de la plaga puede durar entre 24 y 40 días (Figura 8), siendo más corto en condiciones de mayor temperatura. Los huevos son puestos en grupos o masas de 100 a 150, protegidos por una telilla transparente, las hembras pueden oviponer un promedio de 1000 huevos en total durante su vida (Juárez *et al.*, 2010). En los cultivos como el maíz, independientemente de su estado fenológico, son colocados sobre las hojas, en la parte media de la planta, preferentemente en el envés o en la zona basal de las mismas. El período larval dura un promedio de 25 días, pasando generalmente por seis estadios, para completar su desarrollo, las larvas consumen un promedio total de 179,7 cm² de superficie foliar de hojas de maíz y dejan de alimentarse justo antes de alcanzar el último estadio larval. Para pupar, se entierran en el suelo, entre 3 y 5 cm de profundidad, donde forman una cámara pupal, en la cual permanecen por 10 días aproximadamente, para posteriormente emerger como adultos (Rezende *et al.*, 1994).

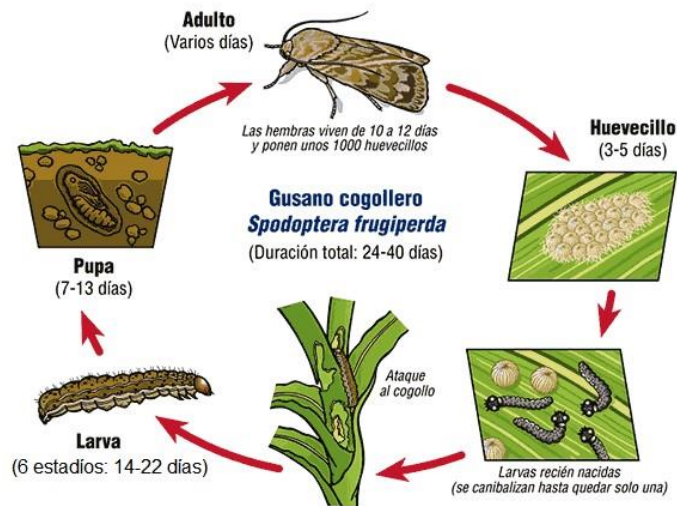


Figura 8. Ciclo biológico de *S. frugiperda* (Tomada de: www.croplifela.org)

2.4.2 Control biológico de *S. frugiperda*

En México, su control ha dependido del uso de insecticidas químicos, requiriéndose de varias aplicaciones por ciclo, sin embargo, estos productos químicos tienen impactos negativos en el ambiente, particularmente por la eliminación de la entomofauna benéfica, intoxicación de trabajadores agrícolas, residualidad en los alimentos, además de inducir la aparición de resistencia en el insecto blanco (Cabrera et al., 2012; Jafari *et al.*, 2010), razones por las cuales el control biológico surge como una alternativa viable al uso de estos productos, particularmente mediante el uso de microorganismos entomopatógenos.

En la actualidad, se han reportado altas tasas de mortalidad de *S. frugiperda* causadas por entomopatógenos, tales como hongos, bacterias, virus, nemátodos, entre otros (Estrada, 2013).

3. Justificación

Los nemátodos entomopatógenos han desarrollado estrategias de patogenicidad a insectos, permitiendo que sean utilizados como agentes de control biológico de insectos plaga, ya que son seguros tanto para el usuario como para el ambiente, su capacidad infectiva se basa en la simbiosis que presenta con bacterias, estas bacterias son capaces de entrar al hospedero utilizando al nemátodo para después proliferar y causar la muerte del insecto. Las interacciones bacterianas son importantes porque pueden aumentar la mortalidad del insecto objetivo y útiles para el descubrimiento de productos biológicamente activos, así como para entender su significado ecológico y su diversidad. En este trabajo se determinará el tipo de interacción bacteriana de las cepas aisladas de los nemátodos MC5 (*O. myriophila*), DS (*C. brenneri*) y XRPC4 (*Hererorhabditoides sp.*), para posteriormente, evaluar su patogenicidad en larvas de *S. frugiperda*. Esta investigación complementará los estudios sobre las cepas bacterianas de Nemátodos entomopatógenos permitiendo el desarrollo de nuevas técnicas para el control biológico.

4. Hipótesis

Al menos dos o más de las cepas bacterianas DS-R (*Serratia*), DS-B (*Bacillus*), MC5-R (*Serratia*), XRPC4-1, XRPC4-2 aisladas de los nemátodos MC5 (*O. myriophila*), DS (*C. brenneri*) y XRPC4 (*Heterorhabditoides sp.*) y *B. thuringiensis* HD1 presentará sinergismo como interacción bacteriana.

5. Objetivo General

Identificar las interacciones entre las cepas MC5-R (*Serratia*), DS-R (*Serratia*), DS-B (*Bacillus*), XRPC4-1 y XRPC4-2 aisladas de los nemátodos MC5 (*O. myriophila*), DS (*C. brenneri*) y XRPC4 (*Heterorhabditoides sp.*) y *B. thuringiensis* HD1, evaluando su patogenicidad en *S. frugiperda*.

6. Objetivos particulares

1. Evaluar las interacciones de las cepas bacterianas MC5-R (*Serratia*), DS-R (*Serratia*), DS-B (*Bacillus*), XRPC4-1, XRPC4-2 y *B. thuringiensis* HD1 en medio de cultivo.
2. Evaluar la patogenicidad de las cepas bacterianas MC5-R (*Serratia*), DS-R (*Serratia*), DS-B (*Bacillus*), XRPC4-1, XRPC4-2 y *B. thuringiensis* HD1 sobre larvas de *S. frugiperda* en bioensayos por inyección y por alimentación.
3. Estimar la interacción de las cepas bacterianas MC5-R (*Serratia*), DS-R (*Serratia*), DS-B (*Bacillus*), XRPC4-1, XRPC4-2 y *B. thuringiensis* HD1 sobre larvas de *S. frugiperda*.

7. Materiales y Métodos

7.1 Ubicación del estudio

Este trabajo se realizó en las instalaciones del Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

7.2 Material Biológico

Se utilizaron las cepas bacterianas MC5-R (*Serratia*), DS-R (*Serratia*), DS-B (*Bacillus*), XRPC4-1 y XRPC4-2 aisladas de los nemátodos MC5 (*O. myriophila*), DS (*C. brenneri*) y XRPC4 (*Heterorhabditoides sp.*) y *B. thuringiensis* HD1 proporcionada por el Laboratorio de Parasitología Vegetal del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Se emplearon larvas de *S. frugiperda* de 5° estadio para las evaluaciones vía inyección y neonatas para las evaluaciones vía oral obtenidas de la cría en el Laboratorio de Control Biológico del Centro de Investigación en Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, para pruebas de patogenicidad.

7.3 Recuperación de las cepas bacterianas MC5-R, DS-R y DS-B

La recuperación de las cepas se llevó a cabo inoculando un matraz de 250 mL conteniendo 50 ml de medio LB líquido (Cuadro 3) para cada una de las cepas y se incubaron durante 24 h a 27°C con agitación, después se sembró cada una de las cepas en medio LB adicionado con 15 gr de agar.

Cuadro 3. Medio LB líquido

Ingrediente	Cantidad
Cloruro de sodio	10g
Peptona	10g
Extracto de levadura	5g
Agua destilada	1000mL

7.4 Obtención de colonias puras

La obtención de las colonias puras se realizó mediante la técnica de estriada cruzada, la cual consiste en esterilizar en el mechero el asa y luego tomar una asada de la colonia, hacer una serie de estrías en una nueva placa de agar (Figura 9). Después flamear el asa de inoculación y rozar con el asa una vez la superficie del conjunto anterior de estrías y realizar una nueva serie de estrías, se repitió el procedimiento una vez más para así incubar la caja a 27°C durante 24 horas (Ramos y Pérez, 2004).

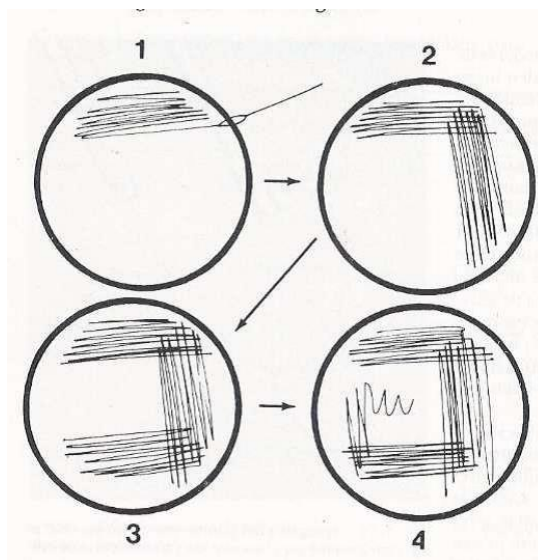


Figura 9. Técnica de estriada cruzada.

7.5 Pruebas de inhibición entre bacterias en medio sólido

Las pruebas de antagonismo entre las cepas bacterianas se realizaron inoculando un matraz de 250ml de caldo LB para cada uno de los aislados y se incubaron durante 96 horas, transcurrido el tiempo se obtuvo 1mL de cultivo, se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos y se recuperó el sobrenadante. Se sembró una placa de agar LB con el método de botón en césped, inoculando 10 μ l de una de las cepas y extendiéndose masivamente sobre la superficie del medio, aparte, discos de papel fueron inoculados de manera individual con 10 μ L de las demás cepas a evaluar, los discos fueron colocados de forma dispersa sobre la superficie del medio inoculado con la cepa masiva (Figura 10), posteriormente se incubaron a 27 \pm 2°C durante 48 horas. Para la interpretación de los resultados se tuvo en cuenta la presencia o ausencia de halos de inhibición.

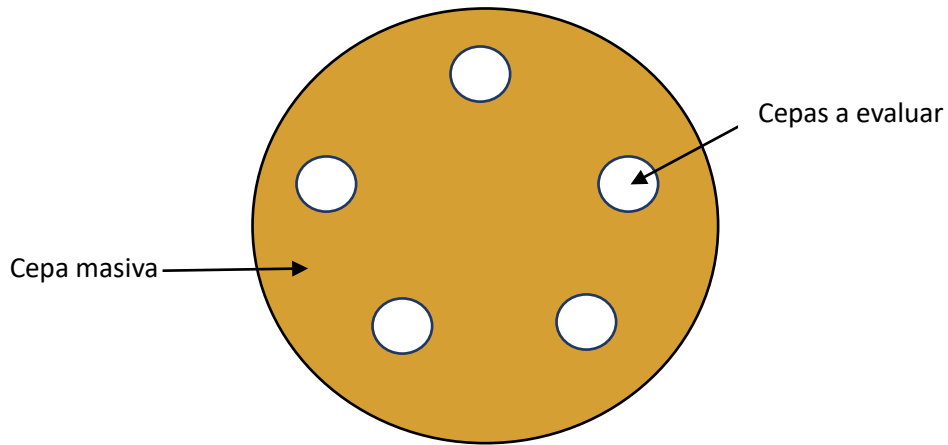


Figura 10. Representación del método de las pruebas de inhibición en medio sólido.

7.6 Evaluación de patogenicidad de las interacciones bacterianas en *S. frugiperda*

Se llevaron a cabo bioensayos que consistieron en infectar a las larvas por medio de inyección y mediante su alimentación.

7.6.1 Bioensayos de patogenicidad por alimentación

Los bioensayos por medio de alimentación se llevaron a cabo sobre 10 larvas neonatas de *S. frugiperda*, con 3 repeticiones por tratamiento; se determinó la concentración de los diferentes tratamientos (Cuadro 4) a través de un bioensayo ventana.

Cuadro 4. Combinaciones de cepas para las evaluaciones de las interacciones.

Cepa 1	Cepa 2
DS-R	DS-B
DS-R	XRPC4-2
DS-B	MC5-R
DS-B	XRPC4-1
DS-B	XRPC4-2
DS-B	Bt HD1
XRPC4-1	XRPC4-2
XRPC4-1	Bt HD1
XRPC4-2	Bt HD1

Para el bioensayo ventana se determinaron a una dosis alta y baja, las dosis se obtuvieron por medio de diluciones y conteos en la cámara de Neubauer que consistieron en poner 10 μL de la suspensión bacteriana con la ayuda de una micropipeta en los pozos de la cámara y, con la ayuda de un contador manual, se contaron las células de los cuadrantes laterales; una vez hecha la dilución, se llevó a un volumen final de 30 μL por pozo, la suspensión de bacterias se colocaron de manera superficial en la dieta merídica (1.5 ml) vertida en placas de cultivo de 24 pozos (Cell Well de Corning) y se esparció homogéneamente hasta cubrir la superficie de la dieta, se dejó secar a temperatura ambiente y posteriormente se colocó una larva por pozo; las placas se cubrieron con una película plástica tipo food wrap para evitar que las larvas escapen y se realizó una pequeña perforación con una aguja en cada pozo. Se colocó encima del plástico una sanita para finalmente colocar la tapadera y sujetarla con cinta Masking Tape.

Se permitió que las larvas se alimenten de la dieta durante 7 días y se determinó el porcentaje de mortalidad, posteriormente se realizó un ANOVA y una prueba Tukey con el programa Rcomander.

7.6.2 Bioensayos de patogenicidad por inyección

Los bioensayos por medio de inyección se llevaron a cabo sobre 10 larvas de 5° estadio de *S. frugiperda*, con 3 repeticiones; estos consistieron en infectar a las larvas con los diferentes tratamientos conformados por combinaciones de las cepas MC5-R, DS-R, DS-B, XRPC4-1 y XRPC4-2 y Bt HD1 (cuadro 4) a una dosis de 0.5×10^2 células/ml para cada uno de los tratamientos. Las larvas se desinfectaron superficialmente con alcohol al 70%, después se inocularon con cada uno de los tratamientos; se colocaron en cajas Petri con dieta merídica.

Se evaluó el porcentaje de mortalidad y el cambio de coloración de la cutícula a las 24 y 48 horas, posteriormente se realizó un ANOVA y una prueba Tukey con el programa R-comander.

7.7 Determinación de las interacciones sinergismo, antagonismo y aditividad sobre *S. frugiperda*.

Para determinar las interacciones se llevó a cabo bioensayos con diferentes tratamientos, cuantificando la mortalidad de las larvas de *S. frugiperda*.

Para el cálculo de sinergismo, antagonismo o aditividad, se utilizó la fórmula de valor esperado de mortalidad de Finney. La fórmula para encontrar el valor esperado es la siguiente: $E = ((X(1 - X)(Y)) + ((1 - X)(1 - Y)(Z)))$

E = Valor esperado

X = Mortalidad del Testigo

Y = Mortalidad factor 1

Z = Mortalidad factor 2

Se considera sinergismo cuando el valor esperado de la interacción es menor que el observado y al realizar la prueba de X^2 presentan diferencias estadísticas significativas. De igual manera, si el valor esperado de la interacción es mayor que el observado y también presentan diferencias estadísticas significativas, se considera antagonismo. Sin embargo, si al comparar el valor observado y el esperado de la interacción no presentan diferencias estadísticas significativas se considera aditividad.

8. Resultados

8.1 Pruebas de inhibición entre bacterias en medio sólido

En las pruebas de inhibición se observó que las combinaciones DS-R & DS-B, DS-R & XRPC4-2, DS-B & MC5-R, DS-B & XRPC4-1, DS-B & XRPC4-2, DS-B & Bt HD1, XRPC4-1 & XRPC4-2, XRPC4-1 & Bt HD1, XRPC4-2 & Bt HD1 fueron las que no presentaron inhibición, por otro lado, en las combinaciones DS-R & MC5-R, DS-R & XRPC4-1, DS-R & Bt HD1, MC5-R & DSR, MC5-R & XRPC4-1, MC5-R & XRPC4-2, MC5-R & Bt HD1 presentaron halos de inhibición (Cuadro 5).

En total nueve combinaciones no presentaron inhibición y siete combinaciones si presentaron inhibición entre ellas; siendo la cepa DS-B la que no presentó inhibición con ninguna de las demás

cepas, mientras que MC5-R la que presentó inhibición con casi todas las cepas a excepción de DSB.

Cuadro 5. Resultados de las pruebas de inhibición entre las cepas bacterianas. Las cepas entre * son las cepas que se sembraron de forma masiva. *

Cepas	DS-R	DS-B	MC5-R	XRPC4-1	XRPC4-2	Bt HD1
DS-R		-	+	+	-	+
DS-B	-		-	-	-	-
MC5-R	+	-		+	+	+
XRPC4-1	+	-	+		-	-
XRPC4-2	-	-	+	-		-
Bt HD1	+	-	+	-	-	

Con inhibición: + Sin inhibición: -

8.2 Evaluación de patogenicidad de las interacciones bacterianas en *S. frugiperda*

Para determinar la patogenicidad de las interacciones bacterianas se realizaron bioensayos utilizando larvas de 5º estadio y neonatas.

8.2.1 Bioensayos de patogenicidad por alimentación

Para los bioensayos de patogenicidad por el método de alimentación se realizó un bioensayo ventana para determinar la concentración a utilizar, se tomaron como referencia cuatro dosis 2.5 células/mL, 0.5×10^2 células/mL, 0.6×10^3 células/mL y 1.2×10^4 células/mL; siendo de 1.2×10^4 células/mL la dosis con mejores resultados, en las dosis 2.5 células/ml, 0.5×10^2 células/mL y 0.6×10^3 células/mL las larvas no mostraron mortalidad, solo se observó diferencias en su crecimiento, por lo tanto, el bioensayo posterior se realizó a la dosis de 1.2×10^4 células/ml y como control se utilizó agua destilada estéril.

A los siete días posteriores a la exposición, se registró el porcentaje de mortalidad de cada uno de los tratamientos; en donde se observó que la cepa MC5-R fue el que presentó el menor porcentaje de mortalidad, con solo el 23.33% comparándola con las demás cepas utilizadas de forma individual, mientras que XRPC4-1 obtuvo la mayor mortalidad con 50%. Es de notar que, de los tratamientos con las combinaciones, fue la mezcla XRPC4-1 & Bt HD1, con el 73.33% de mortalidad, el tratamiento con mayor mortalidad (Fig. 8). En todos los tratamientos se observó que las larvas muertas fueron afectadas en el estadio de neonatas.

Por otro lado, se observó que en los tratamientos individuales DS-R, XRPC4-1, XRPC4-2, MC5R, Bt HD1 y las combinaciones DS-B & Bt HD1, XRPC4-1 & XRPC4-2, XRPC4-1 & Bt HD1, el crecimiento de las larvas sobrevivientes no era uniforme, es decir, algunas eran mucho más grandes que otras (Fig.12); el control en cambio no presentó mortalidad y se observó un crecimiento uniforme. En todos los tratamientos se observó que las larvas muertas fueron en el estadio de neonatas.

En la prueba de Tukey los tratamientos de las combinaciones DS-B & XRPC4-1, DS-B & XRPC4-2, DS-B & Bt HD1 y XRPC4-2 & Bt HD1 no presentaron diferencias significativas; de igual forma los tratamientos de las combinaciones con diferencias significativas fueron DS-B & MC5-R, XRPC4-1 & XRPC4-2 y XRPC4-1 & Bt HD1 (Fig. 11).

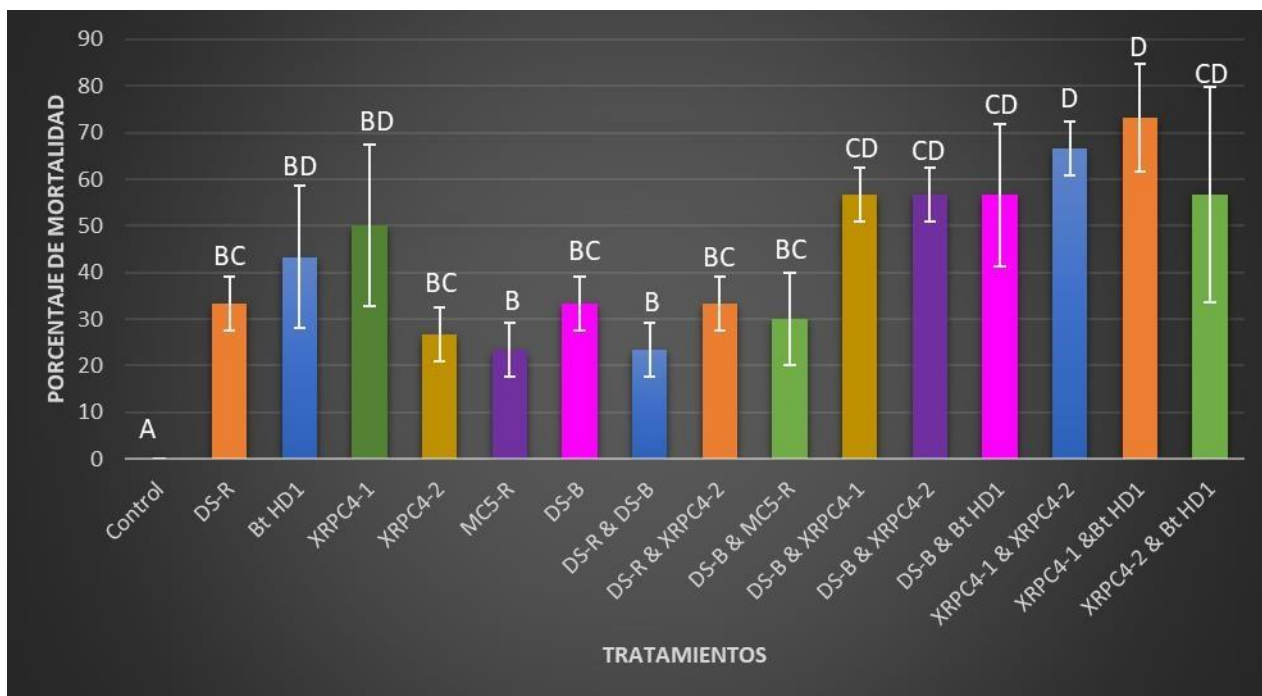


Figura 11. Porcentaje de mortalidad \pm Desviación Estándar de los bioensayos de patogenicidad por alimentación con una dosis de 1.2×10^4 células/ml. *Letras iguales no presentan diferencias significativas ($P < 0.05$)*



Figura 12. Tratamiento con XRPC4-2 en donde se observan larvas vivas que no crecieron de forma uniforme.

8.2.1.1 Determinación de las interacciones sobre *S. frugiperda*

Para determinar el efecto de las combinaciones se calculó la mortalidad esperada con la fórmula de Finney, y se calculó la X^2 .

Se observó sinergismo en los tratamientos de las combinaciones DS-B & XRPC-2, XRPC-1 & XRPC-2 y XRPC-1 & Bt HD1; por otro lado, las cepas con aditividad fueron DS-R & DS-B, DS-R & XRPC-2, DS-B & MC5-R, DS-B & XRPC-1, DS-B & Bt HD1 y XRPC-2 & Bt HD1 (Cuadro 6).

Cuadro 6. Interacciones de los bioensayos de alimentación.

Combinaciones		Mortalidad esperada	Mortalidad Observada	X^2	Efecto
DS-R	DS-B	22.22	23.33 ± 5.77	0.05	Aditividad
DS-R	XRPC4-2	17.77	33.33 ± 5.77	13.63	Aditividad
DS-B	MC5-R	15.55	30 ± 10	13.42	Aditividad
DS-B	XRPC4-1	33.33	56.66 ± 5.77	16.33	Aditividad
DS-B	XRPC4-2	17.77	56.66 ± 5.77	85.14	Sinergismo
DS-B	Bt HD1	28.88	56.66 ± 15.27	26.73	Aditividad
XRPC4-1	XRPC4-2	13.33	66.66 ± 5.77	213.41	Sinergismo
XRPC4-1	Bt HD1	21.66	73.33 ± 11.54	123.27	Sinergismo
XRPC4-2	Bt HD1	31.17	56.66 ± 23.09	20.85	Aditividad

8.2.2 Bioensayos de patogenicidad por inyección

Para los bioensayos de patogenicidad por inyección la dosis que se utilizó fue de 0.5×10^2 células/ml la cual se obtuvo mediante diluciones y conteos en la cámara de Neubauer, estas se inyectaron directamente en el hemocele de la larva con la ayuda de una jeringa de insulina de 30 unidades, posteriormente, el porcentaje de mortalidad se registró a las 24 y 48 horas; como control se utilizó agua destilada estéril.

A las 24 horas el control seguía vivo, pero el tratamiento con la cepa DS-B ya presentaba larvas muertas, sin embargo, aún no se observan cambios de color; las larvas muertas de MC5-R, DS-R ya empezaban a presentar un color rojizo y estaban flácidas; para los tratamientos XRPC4-1, XRPC4-2, Bt HD1, DS-B & XRPC4-2, DS-B & Bt HD1, XRPC4-1 & XRPC4-2, XRPC4-1 & Bt HD1 y XRPC4-2 & Bt HD1 las larvas muertas presentaban flacidez y su coloración era oscura. Por otro lado, el tratamiento de DS-R & DS-B presentaba larvas muertas con una tonalidad rojiza muy tenue, también en DS-R & XRPC4-2, DS-B & MC5-R se observaban algunas larvas muertas con un tono rojo encendido; por otro lado, se observó que algunas larvas muertas presentaron coloración roja y otras oscura para DS-B & XRPC4-1; a las 24 horas el porcentaje de mortalidad era muy bajo para los tratamientos DS-B, XRPC4-1, DS-R & DS-B y DS-R & XRPC4-2; mientras que para MC5-R, Bt HD1 y XRPC4-2 ya casi todas las larvas se encontraban muertas (Figura 14); los tratamientos con las combinaciones que presentaron mayor mortalidad fueron DSB & Bt HD1 y XRPC4-1 & Bt HD1 con el 96.66 %, mientras que el tratamiento de las combinaciones con menor mortalidad fue DS-R & DS-B con el 43.33% (Fig. 16).

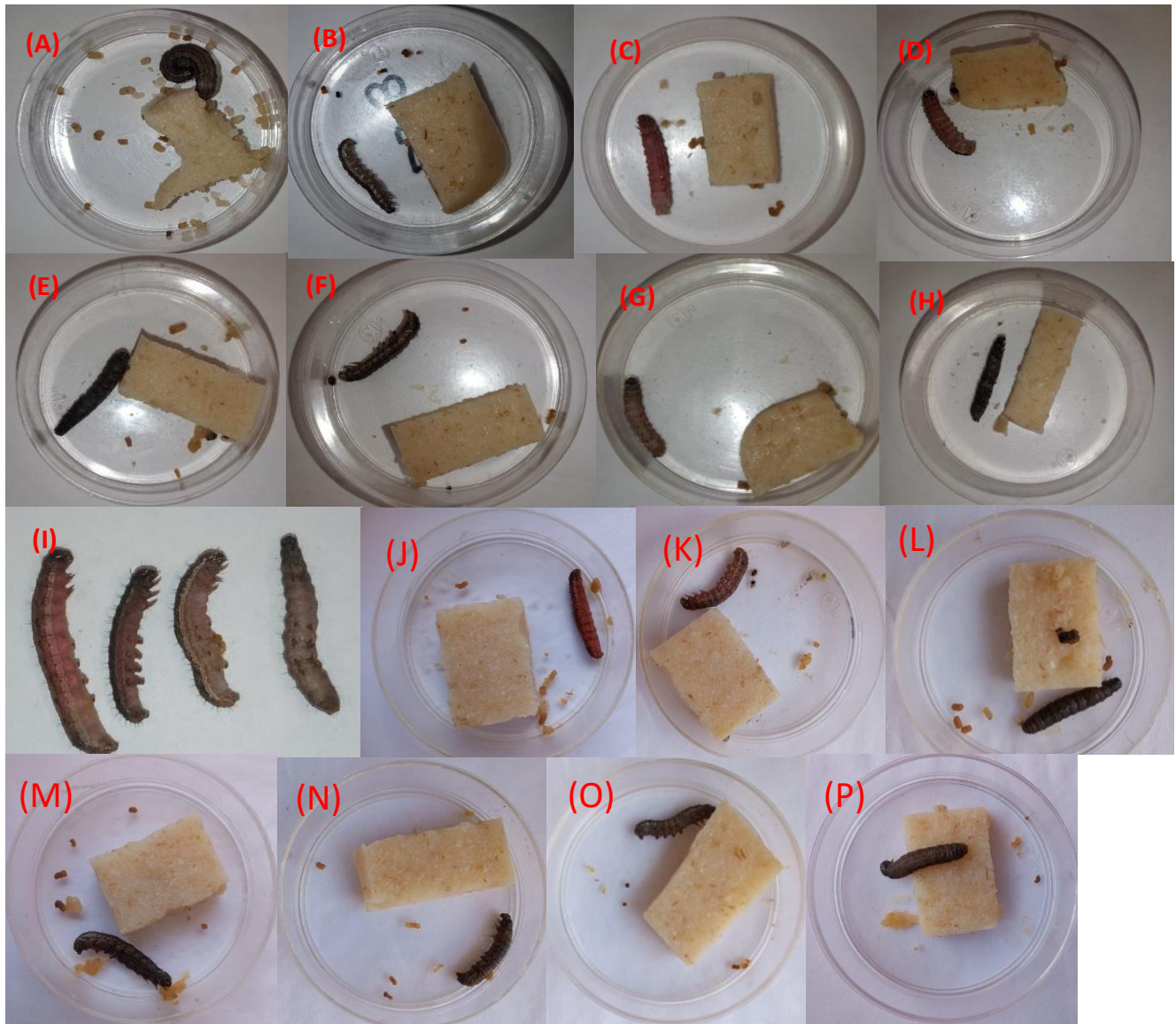


Figura 13. Larvas de los bioensayos por inyección a las 24 hrs, (A) Control, (B) DS-B, (C) MC5-R, (D) DS-R, (E) XRPC4-2, (F) XRPC4-1, (G) DS-R & DS-B, (H) Bt HD1, (I) DS-R & XRPC4-2, (J) DS-B & MC5-R, (K) DS-B & XRPC4-1, (L) DS-B & XRPC4-2, (M) DS-B & Bt HD1, (N) XRPC4-1 & Bt HD1, (O) XRPC4-2 & Bt HD1 y (P) XRPC4-1 & XRPC4-2.

A las 48 hrs todas las larvas de control seguían vivas y casi no tenían comida, por lo que su apetito no se vio modificado por la inyección (Figura 14); DS-B presentaba una mortalidad de 36.66% y las larvas muertas se observaban secas. MC5-R presentaba una mortalidad del 100% y las larvas muertas presentaron un color rojo intenso (Figura 15); de igual forma DS-R tuvo 100% de mortalidad, pero a diferencia de MC5-R las larvas presentaban un tono rojo muy tenue (Fig. 16).

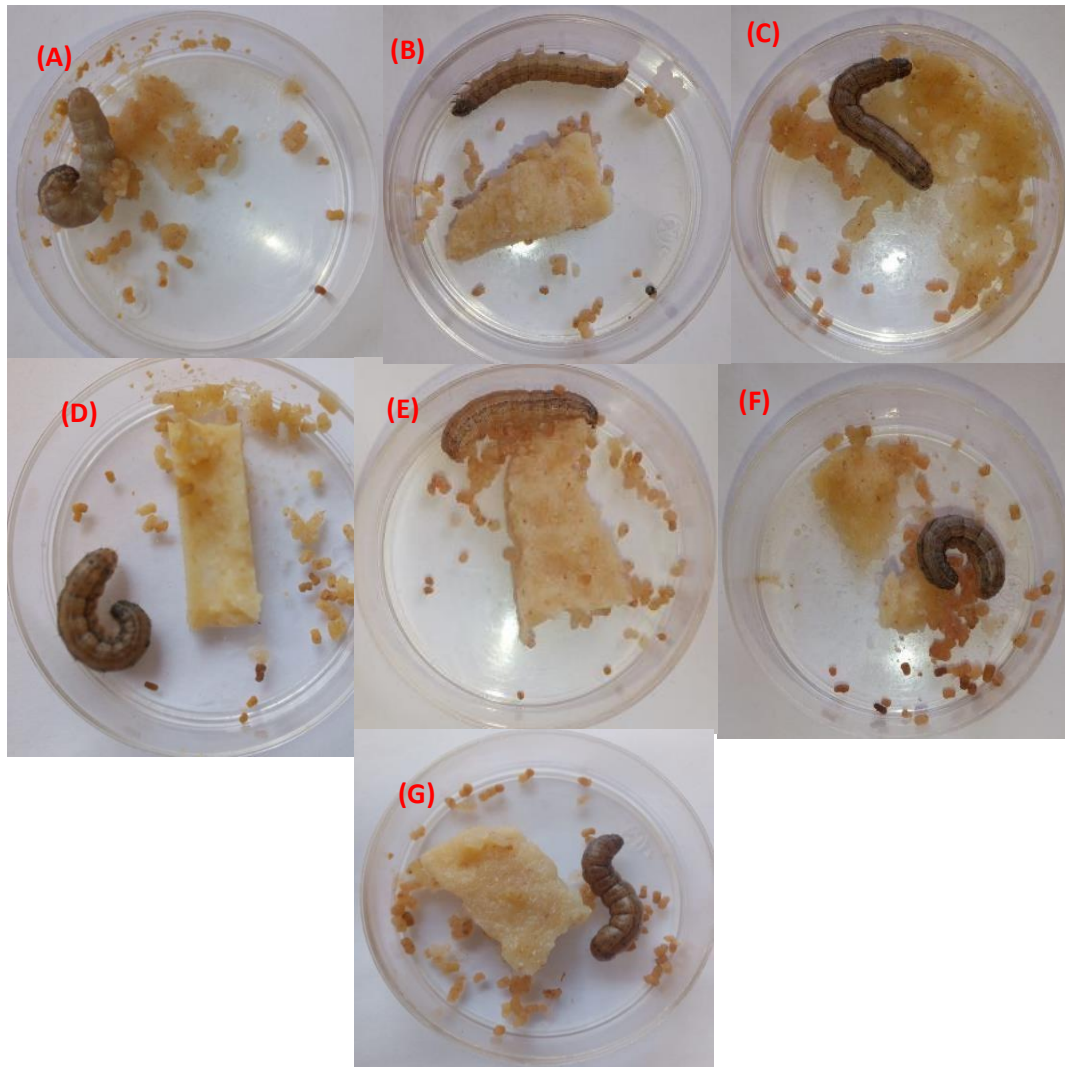


Figura 14. Larvas vivas de los bioensayos de patogenicidad por inyección a las 48 horas, (A) DS-R & XRPC4-2, (B) XRPC4-2, (C) Bt HD1, (D) XRPC4-1, (E) DS-B, (F) Control y (G) DS-B & XRPC4-1.

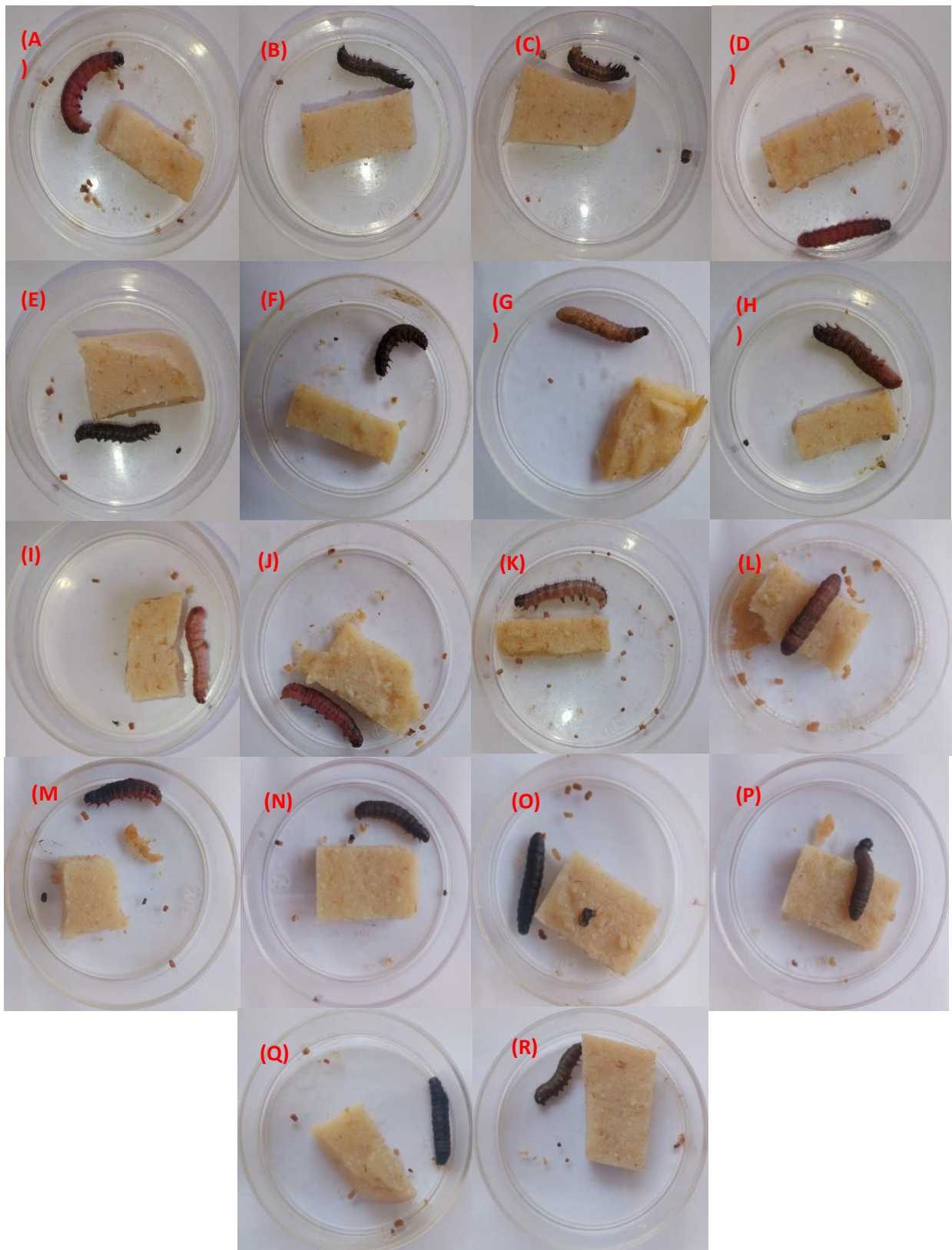


Figura 15. Larvas muertas de los bioensayos de patogenicidad por inyección a las 48 horas, (A) MC5-R, (B) XRPC4-2, (C) XRPC4-1, (D) XRPC4-1 larva roja primera repetición, (E) DS-B, (F) Bt HD1, (G) DSR & DS-B, (H) DS-R & XRPC4-2, (I) DS-R, (J) DS-R & DS-B y (K) DS-R & XRPC4-2, (L) DS-B & XRPC4-1, (M) DS-B & MC5-R, (N) DS-B & XRPC4-2, (O) DS-B & Bt HD1, (P) XRPC4-1 & XRPC4-2, (Q) XRPC4-1 & Bt HD1 y (R) XRPC4-2 & Bt HD1.

En la prueba de Tukey a las 24 horas de los tratamientos de las combinaciones DS-B & Bt HD1, XRPC4-1 & XRPC4-2, XRPC4-1 & Bt HD1 y XRPC4-2 & Bt HD1 no tuvieron diferencias significativas; al igual que DS-B & MC5-R con DS-B & XRPC4-2 y DS-R & XRPC4-2 con DS-B & XRPC4-1 no tuvieron diferencias significativas entre sí. Por otro lado, DS-B & XRPC4-1 fue el único tratamiento de las combinaciones que presentó diferencias significativas.

Así mismo, al realizar la prueba de Tukey a las 48 horas los tratamientos de las combinaciones DS-R & DS-B, DS-B & MC5-R, DS-B & XRPC4-2, DS-B & Bt HD1, XRPC4-1 & XRPC4-2, XRPC4-1 & Bt HD1 y XRPC4-2 & Bt HD1 no presentaron diferencias significativas; al igual que DS-R & XRPC4-2 no presentó diferencias significativas con DS-B & XRPC4-1.

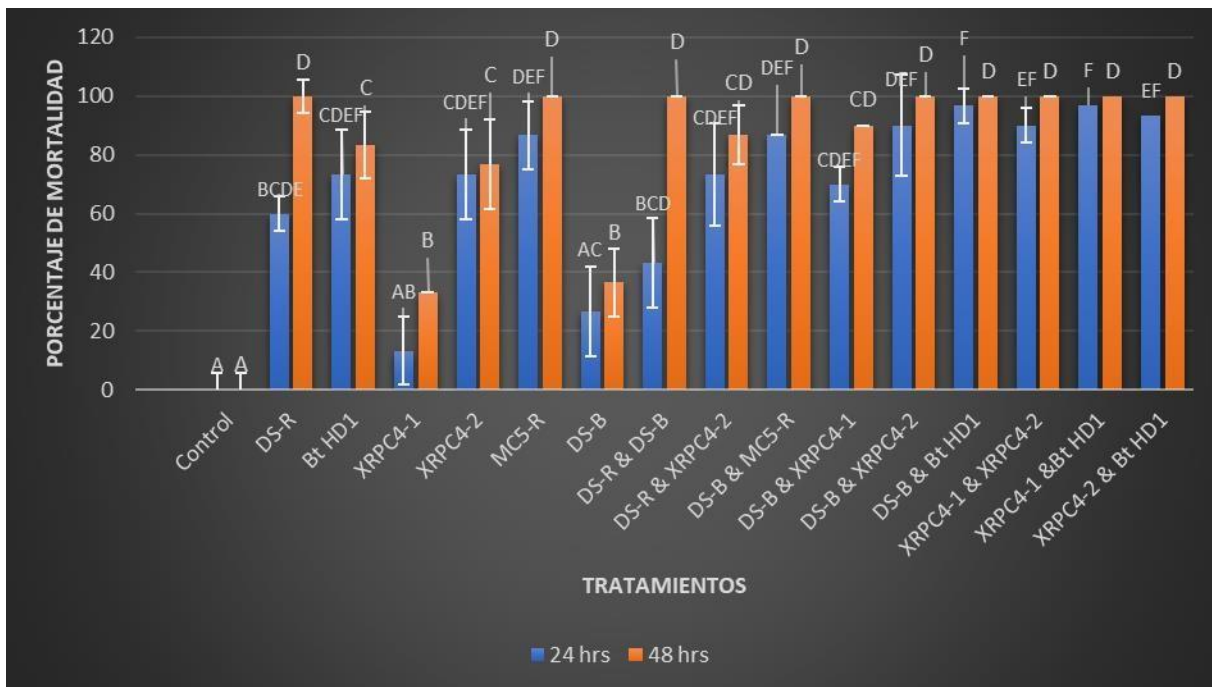


Figura 16. Porcentaje de mortalidad \pm Desviación Estándar de los bioensayos de patogenicidad por inyección a las 24 y 48 horas a una dosis de 0.5×10^2 células/ml. *Letras iguales no presentan diferencias significativas *

8.2.2.1 Determinación de las interacciones sobre *S. frugiperda*

Para la determinación de las interacciones de los bioensayos por inyección se tomó en cuenta la mortalidad a las 24 horas, se determinó la mortalidad esperada y la X^2 ; se determinó que los tratamientos que mostraron sinergismo fueron DS-R & DS-B, DS-R & XRPC4-2, DS-B & XRPC4-1 y XRPC4-2 & Bt HD1 (Cuadro 7).

Cuadro 7. Interacciones de los bioensayos por inyección a las 24 horas.

Combinaciones		Mortalidad esperada	Mortalidad Observada	X²	Efecto
DS-R	DS-B	10.66	43.33 ± 11.54	24.63	Sinergismo
DS-R	XRPC4-2	29.33	73.33 ± 15.27	26.40	Sinergismo
DS-B	MC5-R	63.55	86.66 ± 15.27	6.16	Aditividad
DS-B	XRPC4-1	9.77	70 ± 17.32	51.82	Sinergismo
DS-B	XRPC4-2	53.78	90 ± 0	14.57	Aditividad
DS-B	Bt HD1	53.78	96.66 ± 5.77	19.02	Aditividad
XRPC4-1	XRPC4-2	63.55	90 ± 17.32	7.77	Aditividad
XRPC4-1	Bt HD1	63.55	96.66 ± 5.77	11.34	Aditividad
XRPC4-2	Bt HD1	19.55	93.33 ± 5.77	58.32	Sinergismo

9. Discusión

Los nemátodos entomopatógenos son considerados como una alternativa en el control biológico de insectos, su capacidad infectiva se basa en la simbiosis que presentan con bacterias; estas bacterias son capaces de entrar al hospedero utilizando al nemátodo para después proliferar (Cubillas & Flores, 2016; Goodrich & Clarke, 2007; Kaya & Gaugler, 1993; Uribe *et al.*, 2005).

Las bacterias asociadas a los nemátodos entomopatógenos son capaces de causar una enfermedad mediada por factores de patogenicidad como toxinas y enzimas (Jurat & Jackson, 2012). En los ecosistemas existen una variedad de relaciones entre microorganismos de diferentes especies, la importancia de las interacciones bacterianas está en el aumento de la mortalidad de los insectos portadores y su importancia para el descubrimiento y desarrollo de productos biológicamente activos (Jurat & Jackson, 2012; Moreno, 2017; Sáenz, 2005).

En el presente trabajo se analizaron las interacciones entre 6 cepas bacterianas aisladas de nemátodos entomopatógenos, complementando los estudios sobre estas y permitiendo el desarrollo de nuevos métodos más efectivos para el control biológico.

Se realizaron pruebas de inhibición en medio sólido de las cuales nueve combinaciones no mostraron inhibición, y siete combinaciones mostraron inhibición entre sí indicando antagonismo entre ellas; estos datos pueden considerarse como pioneros dado que no se reportan investigaciones entre los géneros de estas cepas. Es importante resaltar que a pesar de estos enfrentamientos en medio sólido, cabe la posibilidad de que el comportamiento cambie totalmente ya que los mecanismos de inhibición son mediados por medio de sustancias o competencia por sustratos y en campo los factores abióticos alteran positiva o negativamente las interacciones (Moreno, 2017).

Por lo mencionado anteriormente era necesario realizar bioensayos de patogenicidad de las cepas que no presentaron inhibición para rectificar los resultados de la prueba de inhibición y determinar la interacción de estas cepas.

En este estudio se utilizaron dos métodos para la evaluación de la patogenicidad (Cruz, 2018; Regev *et al.*, 1996) como fueron alimentación e inyección; era importante realizar los bioensayos por alimentación ya que esta es la técnica utilizada en el control de plagas de campo.

En los bioensayos por alimentación se observó que las larvas que no murieron presentaron un retraso en su crecimiento haciendo extremadamente baja la probabilidad de que las larvas subdesarrolladas sobrevivan en el entorno natural (Regev *et al.*, 1996).

Regev y colaboradores (1996) en su evaluación de la actividad sinérgica de *B. thuringiensis* y las endoquitinasas de *S. marcescens* sobre *S. littoralis* observaron que al agregar una concentración mayor de endoquitinasas que proteínas Cry, el peso de las larvas aumentaba permitiendo su desarrollo; por lo que se puede decir que en los tratamientos de las combinaciones que tienen cepas como DS-R y MC5-R, obtuvieron una mortalidad baja y las larvas vivas crecieron más que otros tratamientos. Por lo tanto para completar este trabajo se tendría que tomar en cuenta el realizar más bioensayos evaluando estos tratamientos con diferentes dosis de las cepas pertenecientes al género *Serratia*. De igual forma, realizar bioensayos con larvas de estadios más avanzados para observar el efecto de las interacciones en el desarrollo de las larvas.

La mortalidad observada fue mayor en los bioensayos por inyección con hasta el 100%, mientras que los valores más altos de mortalidad en los bioensayos de alimentación fue de 73.33%; los porcentajes de mortalidad tan altos en los bioensayos por inyección coinciden con Campos y colaboradores (2009), quienes evaluaron la patogenicidad de la bacteria simbiote *Xenorhabdus* de un nemátodo aislado en España, en donde utilizaron larvas de *S. littoralis* inyectándoles 20µl a una concentración de 10⁴ células reportando a las 48 horas un porcentaje de mortalidad de hasta 100%. De igual manera, Salvadori y colaboradores (2012) realizaron pruebas de patogenicidad sobre *S. frugiperda* de bacterias simbiotes pertenecientes a los géneros *Photorhabdus* y *Xenorhabdus* de varias especies de nemátodos entomopatógenos en Brasil; inyectando las bacterias a una concentración de 10⁴ células presentando hasta un 90% de mortalidad después de 3 días (Campos *et al.*, 2009; Salvadori *et al.*, 2012).

En el presente trabajo se pueden observar porcentajes de mortalidad de hasta 96.66% en los tratamientos con combinaciones a las 24 horas, teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente en el trabajo de Salvadori y colaboradores (2012) se puede decir que algunos tratamientos con las combinaciones causaron un efecto mayor y en menor tiempo.

Por otro lado, Sánchez y colaboradores (2003) concluyeron que las quitinasas de *S. marcescens* aumentan la capacidad insecticida de las cepas de *B. thuringiensis* sobre *S. exigua* y *S. littura*; tomando como ejemplo el trabajo de Regev y colaboradores (1996) sobre el efecto de las quitinasas de *S. marcescens* a la proteína Cry 1C aumentando la toxicidad contra *S. littoralis* hasta 6 veces; por

tanto, se podría decir que es más probable observar un sinergismo entre los géneros de *Serratia* y *Bacillus*. En el presente trabajo se observó el sinergismo entre las cepas de estos géneros, como el tratamiento DS-R & DS-B.

Al realizar la determinación de las interacciones con los bioensayos de patogenicidad tanto por inyección como por alimentación se comprobó que las combinaciones que no presentaron antagonismo en las pruebas en medio sólido tampoco lo presentaron en los bioensayos ya mencionados. Así mismo las combinaciones que presentaron sinergismo en los bioensayos de patogenicidad por alimentación no fueron las mismas en los bioensayos de patogenicidad por inyección, esto se puede deber al método utilizado ya que en los bioensayos por inyección se libera la bacteria en el hemocele simulando el papel del nemátodo. Mientras que en los bioensayos por alimentación las bacterias tienen que pasar todas las barreras químicas y físicas para lograr este efecto; por lo que sería importante realizar nuevas pruebas que permitan determinar que el efecto de las combinaciones coincida en todos los métodos, tanto en las pruebas en caja como en los bioensayos de patogenicidad por inyección y alimentación.

10. Conclusiones

Se observó el sinergismo en cuatro tratamientos de los bioensayos por inyección, estos fueron DSR & DS-B, DS-R & XRPC4-2, DS-B & XRPC4-1 y XRPC4-2 & Bt HD1; así como tres tratamientos de los bioensayos por alimentación que fueron DS-B & XRPC4-2, XRPC4-1 & XRPC4-2 y XRPC4-1 & Bt HD1.

Así mismo, se observó cinco tratamientos de los bioensayos por inyección que presentaron aditividad, como fueron DS-B & MC5-R, DS-B & Bt HD1, XRPC4-1 & XRPC4-2 y XRPC4-1 & Bt HD1; por otro lado, en los bioensayos por alimentación se observaron seis tratamientos como DS-R & DS-B, DS-R & XRPC4-2, DS-B & MC5-R, DS-B & XRPC4-1, DS-B & Bt HD1 y XRPC4-2 & Bt HD1.

Las cepas que presentaron inhibición en las pruebas en medio solido fueron siete, DS-R & MC5R, DS-R & XRPC4-1, DS-R & Bt HD1, MC5-R & XRPC4-1, MC5-R & XRPC4-2 y MC5-R & Bt HD1.

11. Perspectivas

- Identificar las cepas DS-B, DS-R, MC5-R, XRPC4-1 y XRPC4-2; con el fin de conocer más específicamente las especies bacterianas de las interacciones de este trabajo.
- Determinar la patogenicidad de los tratamientos con las combinaciones a diferentes dosis de cada cepa.
- Realizar bioensayos de virulencia de las interacciones
- Determinar la DL50 y la CL50 de las interacciones

12. Glosario

Antagonismo

Es la actividad que presentan dos antimicrobianos juntos y es significativamente menor que la suma de las actividades de los dos antimicrobianos cuando actúan separados (De La Fuente et al., 2015).

Bacteriemia

Se define bacteriemia como la invasión del torrente circulatorio por microorganismos.

Concentración letal media

Es la concentración, obtenida por estadística, de una sustancia de la que puede esperarse que produzca la muerte, durante la exposición o en un plazo definido después de ésta, del 50% de los animales expuestos a dicha sustancia durante un periodo determinado.

Dosis letal media

Es la cantidad de un material determinado completo de una sola vez, que provoca la muerte del 50% (una mitad) de un grupo de animales de prueba. La LD50 es una forma de medir el envenenamiento potencial a corto plazo (toxicidad aguda) de un material.

Entomopatógeno

Cualquier agente biótico, normalmente microscópico que origina enfermedad en artrópodos (Cabello, 2010).

Foresis

Tipo de comensalismo en que individuos de una especie usan los de otra especie como medio de transporte.

Patogenicidad

La patogenicidad es la capacidad de un agente infeccioso de producir enfermedad en un huésped susceptible. (Perea et al, 1992).

Simbiosis

Asociación íntima de organismos de especies diferentes para beneficiarse mutuamente en su desarrollo vital.

Sinergismo

Indica que la actividad conjunta de dos antimicrobianos es mayor que la suma de las actividades individuales de los antimicrobianos (De La Fuente et al., 2015)

Tiempo Letal Medio

Valor medio del intervalo de tiempo, calculado estadísticamente, durante el cual se espera que muera el 50% de una población dada, tras la administración aguda de un agente químico o físico, a una determinada concentración y bajo un conjunto de condiciones definidas.

Toxicidad

Capacidad para producir daño a un organismo vivo, en relación con la cantidad o dosis de sustancia administrada o absorbida, la vía de administración y su distribución en el tiempo (dosis única o repetidas), tipo y severidad del daño, tiempo necesario para producir éste, la naturaleza del organismo afectado y otras condiciones intervinientes.

Virulencia

La virulencia es un término cuantitativo que define el grado en que un patógeno puede causar enfermedad (Perea et al, 1992)

13. Literatura

- Akhurst, R., & Boemare, N. (1990). Biology and taxonomy of *Xenorhabdus*. *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*, 1(1), 75–90.
- Alonso, R. (2002). Métodos fenotípicos y genotípicos de análisis intraespecífico en *Serratia marcescens*. Universidad Complutense de Madrid, Vicerrectorado de Extensión Universitaria.
- Cabello, T. (2010). Sistemas de Control biológico de la polilla del tomate. *Enemigos Naturales*, 925, 20–24.
- Cabrera, G., Briano, J., & Briano, A. (2012). El control biológico de plagas. *Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria*, 22(128), 57–64.
- Campos, R., Tailliez, P., Pagès, S., Ginibre, N., Gutiérrez, C., & Boemare, N. (2009). Characterization of *Xenorhabdus* isolates from La Rioja (Northern Spain) and virulence with and without their symbiotic entomopathogenic nematodes (Nematoda: *Steinernematidae*). *Journal of Invertebrate Pathology*, 102(2), 173–181.
- Cares, J. E., & Huang, S. P. (2015). Nemátodo del suelo. In *Manual de Biología de Suelos Tropicales* (Vol. 5, pp. 163–176).
- Castoreña, M., & Catalàn, E. (2004). Determinación de estadios larvales de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) para la construcción de un modelo de predicción. *Folia Entomol. Mex.*, 43(3), 307–312.
- Castro, I. (2020). Aislamiento, identificación y evaluación de tres cepas de nemátodos entomopatógenos en cultivos de caña de azúcar en Morelos. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Cruz, K. (2018). Aislamiento y caracterización de las bacterias simbiotas de los nemátodos entomopatógenos *Heterorhabditoides chongmingensis*, *Oscheius myriophila* y *Caenorhabditis brenneri*. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Cubillas, G., & Flores, Y. (2016). Potencialidad y Retos del Uso de Nemátodos Entomopatógenos para el Control Biológico de Plagas. I: Control biológico mediante una asociación simbiótica NEP- Bacteria. *INVURNUS*, 11(1), 27–36.
- Cuthbertson, A., Head, J., Walters, K., & Gregory, S. (2003). The efficacy of the entomopathogenic nematode, *Steinernema feltiae*, against the immature stages of *Bemisia tabaci*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 83(3), 267–269.
- De-Jun, H., Zhen-huan, G., Zhuang, Q., & Hua, L. (2001). Advance of entomopathogenic nematodes. *Journal of Forestry Research*, 12(4), 257–262.
- De La Fuente, N., Villarreal, M., Ángel, M., León, D., Patricia, A., & Pérez, G. (2015). Evaluación de la actividad de los agentes antimicrobianos ante el desafío de la resistencia bacteriana. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacología*, 46(2), 7–16.
- Esparza, G. (2017). Manejo biológico del gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* Smith) con nemátodo entomopatógenos adherentes en maíz (*Zea mays*). Instituto Politécnico Nacional.
- Estrada, O. (2013). Enemigos naturales asociados al gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) en Nayarit, Mexico. *CONACYT*, 1(1).

- Fimbres, G., & Flores, Y. (2016). Potencialidad y Retos del Uso de Nemátodos Entomopatógenos para el Control Biológico de Plagas. I: Control biológico mediante una asociación simbiótica. *Invurnus*, 11(1), 27–36.
- Fischer, M., Viillard, V., Brunel, B., Normand, P., & Boemare, N. (1999). Polyphasic classification of the genus *Photorhabdus* and proposal of new taxa : *P. luminescens* subsp., *P. luminescens* subsp. nov., *Pm luminescens* subsp. *akhurstii* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *laumondii* subsp. nov., *P. temperata* sp. nov., *Pm temperata* subsp. *temperata* subsp. nov. and *Pm asymbiotica* sp. nov. *International Journal of Sitematic Bacteriology*, 49(4), 1645–1656.
- France, A., Luppichini, P., Urtubia, I., Olivares, N., & Rodríguez, F. (2013). Manejo del Burrito de la vid, *Naupactus xanthographus* (Germar) y otros curculiónidos asociados a vides. *Boletín INIA*, 1(260), 17–23.
- Fu, J. rui, & Liu, Q. zhi. (2019). Evaluation and entomopathogenicity of gut bacteria associated with dauer juveniles of *Oscheius chongmingensis* (Nematoda: Rhabditidae). *MicrobiologyOpen*, 8(9). <https://doi.org/10.1002/mbo3.823>
- Gómez, O. (2019). Descripción de la cámara de Neubauer. *Hemograma*, 1(1), 317–319.
- Goodrich, H., & Clarke, D. (2007). Mutualism and pathogenesis in *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: Two roads to the same destination. *Molecular Microbiology*, 64(2), 260–268. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05671.x>
- Grewal, P., Matsuura, M., & Converse, V. (1997). Mechanisms of specificity of association between the nematode *Steinernema scapterisci* and its symbiotic bacterium. *Parasitology*, 114(5), 483–488.
- Grimont, F., & Grimont, P. (2005). Genus *Serratia*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (pp. 23–28).
- Han, R., & Ehlers, R. (1998). Cultivation of axenic *Heterorhabditis* spp. dauer juveniles and their response to non-specific *Photorhabdus luminescens* food signals. *Nematologica*, 44(4), 425–435.
- Hernández, A., Estrada, B., Rodríguez, H., García, J., Patiño, S., & Osorio, E. (2019). Importancia del control biológico de plagas en maíz (*Zea mays* L.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(4), 803–813.
- Huff, W., Kubena, L., Harvey, R., Corrier, D., & Mollenhauer, H. (1986). Progression of aflatoxicosis in broiler chickens. *Poultry Science*, 65(10), 1891–1899.
- Jafari, R., Goldasteh, S., & Afrogheh, S. (2010). Control of the wax moth *Galleria mellonella* l. (Lepidoptera: pyralidae) by the male sterile technique (mst). *Arch. Biol. Sci*, 62(2), 309–313. <https://doi.org/10.2298/ABS1002309J>
- Juárez, L., Socias, G., Murúa, G., Prieto, S., Medina, S., Willink, E., & Gastaminza, G. (2010). Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Rev. Soc. Entomol. Argent*, 69(4), 209–231.
- Jung, S., & Kim, Y. (2006a). Synergistic effect of entomopathogenic bacteria (*Xenorhabdus* sp. and *Photorhabdus temperata* ssp. *temperata*) on the pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* ssp. *aizawai* against *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environmental Entomology*, 35(6), 1584–1589.

- Jung, S., & Kim, Y. (2006b). Synergistic effect of *Xenorhabdus nematophila* K1 and *Bacillus thuringiensis subsp. aizawai* against *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biological Control*, 39(2), 201–209.
- Jurat, J., & Jackson, T. (2012). Bacterial entomopathogens. *Insect Pathology*, 1(1), 265–349.
- Kalha, C., Singh, P., Kang, S., Hunjan, M., Gupta, V., & Sharma, R. (2014). Virus y bacterias entomopatógenos para el control de plagas de insectos. *Manejo Integrado de Plagas*, 1(1), 225–244.
- Kaya, H., & Gaugler, R. (1993). Nemátodos entomopatógenos. *Revisión Anual de Entomología*, 38(1), 181–206.
- León, J., Brito, O., & Manssu, F. (2018). Evaluation of the biological control of *Spodoptera frugiperda* in corn crop. *Revista Ciencia e Investigación*, 3(11), 18–23. <https://doi.org/10.26910/issn.2528-8083vol3iss11.2018pp18-23p>
- Logan, N., & Vos, P. (2015). *Bacillus*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1–163). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00530>
- Miranda, R., Gómez, I., Soberón, M., & Bravo, A. (2002). Mecanismo de Acción de las Toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*. *Revista Especializada En Ciencias Químico - Biológicas*, 5(1), 5–13.
- Moreno, P. (2017). Evaluación del antagonismo y sinergismo en aislados microbianos obtenidos de *Plukenetia Volubilis L* para la conformación de un consorcio microbiano en condiciones in vitro. Universidad de Santander.
- Nguyen, K. B., & Smart, G. C. (1996). Identification of Entomopathogenic Nematodes in the *Steinernematidae* and *Heterorhabditidae* (Nemata: Rhabditida). *Journal of Nematology*, 28(3), 286–300.
- Petersen, L. M., & Tisa, L. S. (2012). Influence of temperature on the physiology and virulence of the insect pathogen *Serratia sp.* Strain SCBI. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(24), 8840–8844. <https://doi.org/10.1128/AEM.02580-12>
- Poinar, G., & Thomas, G. (1966). Significance of *Achromobacter nematophilus* Poinar and Thomas (Achromobacteraceae: Eubacteriales) in the development of the nematode, DD-136 (*Neoaplectana sp.* *Steinernematidae*). *Parasitology*, 56(2), 385–390.
- Poinar, G., Thomas, G., & Hess, R. (1977). Characteristics of the specific bacterium associated with *Heterorhabditis bacteriophora* (Heterorhabditidae: Rhabditida). *Nematologica*, 23(1), 97–102.
- Regev, A., Keller, M., Strizhov, N., Sneh, B., Prudovsky, E., Chet, I., Ginzberg, I., KonczKalman, Z., Koncz, C., Schell, J., & Zilberstein, A. (1996). Synergistic Activity of a *Bacillus thuringiensis*-Endotoxin and a Bacterial Endochitinase against *Spodoptera littoralis* Larvae. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(10), 3581–3586. <https://journals.asm.org/journal/aem>
- Rezende, M., Cruz, I., & Terezinha, L. (1994). Consumo foliar desenvolvimento de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (SMITH) parasitadas por *Chelonusinsularis* (CRESSON) (HYMENOPTERA:BRACONIDAE). *Anais Da Sociedade Entomológica Do Brasil*, 23(3), 473–478.

- Rodríguez, M. (2019). Caracterización de aislados nativos de nemátodos entomopatógenos y uso potencial contra *Spodoptera frugiperda* (Vol. 1, Issue 1). <https://repositorio.una.edu.ni/3830/1/tnh10r696a.pdf>
- Rojas, J., Virgen, A., & Malo, E. (2004). Seasonal and nocturnal flight activity of *Spodoptera frugiperda* males (Lepidoptera: Noctuidae) monitored by pheromone traps in the coast of Chiapas, México. *Florida Entomologist*, 87(4), 496–503. <https://doi.org/10.1653/0015>
- Ruiz, A., Cruz, R., Salcedo, R., & Barboza, J. (2003). *Serratia marcescens*: de patógeno oportunista al control de insectos que afectan cultivos agrícolas. *BioTecnología*, 8(1), 31–37.
- Ruiz, E., Ruiz, R., Sánchez, J., Molina, J., Skoda, S., Coutiño, R., Pinto, R., Guevara, F., & Foster, J. (2013). Occurrence of entomopathogenic fungi and parasitic nematodes on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae collected in Central Chiapas, México. *Florida Entomologist*, 96(2), 498–503. <https://doi.org/10.1653/024.096.0215>
- Sáenz, A. (2005). Importance of entomopathogenic nematodes for the biological control of pests in oil palm. *Palmas*, 26(2), 41–57.
- Sajnaga, E., & Kazimierzak, W. (2020). Evolution and taxonomy of nematode-associated entomopathogenic bacteria of the genera *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: an overview. *Symbiosis*, 80(1). <https://doi.org/10.1007/s13199-019-00660-0>
- Salvadori, J., Defferrari, M., Ligabue, R., Yamazaki, E., Salvadori, J. R., & Carlini, C. (2012). Characterization of entomopathogenic nematodes and symbiotic bacteria active against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and contribution of bacterial urease to the insecticidal effect. *Biological Control*, 63(3), 253–263. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.08.002>
- Sánchez, A., Camarillo, R., Salcedo, R., Eleazar, J., & Corona, B. (2003). *Serratia marcescens*: de patógeno oportunista al control de insectos que afectan cultivos agrícolas. *Bio Tecnología*, 8(2), 31–37.
- Schünemann, R., Knaak, N., & Fiuza, L. (2014). Modo de acción y especificidad de las toxinas de *Bacillus thuringiensis* en el control de orugas y chinches hediondas en cultivo de soja. *Avisos de Investigación Académica Internacional*, 1(1).
- Sparks, A. (1979). A review of the biology of the fall armyworm. *The Florida Entomologist*, 62(2), 82–87.
- Stuart, R., & Gaugler, R. (1994). Patchiness in populations of entomopathogenic nematodes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 64(1), 39–45.
- Ugras, S., & Demirbag, Z. (2013). Screening antibacterial activity of entomopathogenic bacteria isolated from pests of hazelnut. *Biologia (Poland)*, 68(4), 592–598. <https://doi.org/10.2478/s11756-013-0210-6>
- Uribe, L., Mora, M., & Stock, S. (2005). First record of entomopathogenic nematodes (*Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*) in Costa Rica. *Journal of Invertebrate Pathology*, 88(3), 226–231.

- Vargas, E., & Abarca, G. (1998). Relación entre el estrés y las bacterias entomopatógenas *Pantoea*(*Erwinia*) *agglomerans*(herbicola) y *Bacillus cereus* en jobotos (Col: Melolonthidae) (*Phyllophagaspp.*, *Anomalaspp.* y *Cyclocephalaspp.*). *Agronomía Mesoamericana*, 9(2), 25– 30.
- Villarreal, M., Villa, E., Cira, L., Estrada, M., Parra, F., & De los Santos, S. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 36(1). <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD
DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Licenciatura en Biología

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

Cuernavaca, Morelos a 24 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: **JAIME MALDONADO YARELI**, con el título del trabajo: **INTERACCIONES BACTERIANAS DE CEPAS AISLADAS DE TRES ESPECIES DE NEMÁTODOS ENTOMOPATÓGENOS EVALUADAS EN *Spodoptera frugiperda*.**

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación por Tesis Profesional por Etapas como lo marca el artículo 26° 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. GUADALUPE PEÑA CHORA

SECRETARIO: DR. JOSE AUGUSTO RAMIREZ TRUJILLO

1° VOCAL: DR. VICTOR MANUEL HERNANDEZ VELAZQUEZ

2° VOCAL: M. EN B. TANIA MAREL GUADARRAMA AVILA

3° VOCAL: DR. IVAN ARENAS SOSA

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

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

Sello electrónico

JOSE AUGUSTO RAMIREZ TRUJILLO | Fecha:2023-04-24 11:51:06 | Firmante

Jq14yQzOa3siBBkMM12yzMkKtsucjEw/rEezquxbZqDMu6n6it0e7w0Lhyyp7AI2/KZrHUDw38nIMCU/cbbRdZpQ/2ZpnBmRCI7v9sYmq8z7ep16ba/CqGU4FWpHfn0iPmgqAxMN2jI1dUY8fH4PvwczGX/RX5dXRJ1hIEo3ifnPzMu8tIWNc5Zi6yI2QnxHD0zudFZLfkXr2fWgo1H344uq4VpbFglDLrxE057MCfgy7y5jnJSwTEagTeZfHs0z2F0M2vmD2MumFY6uCuFbbYVANuvrJootlUI/h2oxSE7RSceCaHlc2qd23MFw+VYNQXzxMv12/3i4i7MiLqQt7w==

IVÁN ARENAS SOSA | Fecha:2023-04-24 11:54:21 | Firmante

r34mKdfMMfSekF8OZfN27yhS2dYXuTL9znrHAb4LXmityMOFIHDxLLRpg+rYsATP0kt4rcUR1MfQ8XdYfdqj7QSuMdkWVj/FiboQMLBvr5Ckmj92IQSmG/jaVgf9mPtJpIHEYVJmWrXULFSV7U2Aqe+BGOKzwHGVEi10G6yI9i0Nw0kV1cnubrMZ4u7vT7Aa9RF5VqHH79Wuc1C/DBYFX3RHGz3e0yba/dslqN1PyAtiZ64y2efA6RLAWV7x/hf7+vkjom8VXqZ6Se3PrIN+6INyBfey1MSoW6f8mCWyrJZgEdqglkhaowg4mjuRr8U4C9BHeSLZyf3HrNjx0CJ56Q==

GUADALUPE PEÑA CHORA | Fecha:2023-04-24 12:40:17 | Firmante

OUOB4Q5IU82cRgPGJPaJelL08VTh2sU9+7VyuS3Csb5VwoPzCuaxMCc4gcZ2RLujvLALZXg3oXaWkooUfymgT5/9g8CN4SbnnyU9aPF/2JivcdkHRzzHh+25VbAShGOaySnxjgARoBIg2+c/SaECEiTaCQJfKSgC8B9Lc/f0EunZXZa8AJHdPZRrJXAzhODHphdo1n4pEwjuDqRQORzZqPxxKUCADFKRyZDu/0T+CwQv7n2Zx+C+ulie3tHD9BYIR5ZGEFJtmKDS7jNbnBwkq4gd8wUdJc7OT2licoB0jBY/nyzqAwuUo5qoa1cp3QnQMfKI+i6KeiFLbhOabrOXMaw ==

TANIA MAREL GUADARRAMA AVILA | Fecha:2023 -04-24 13:00:33 | Firmante

h0DmWpq13hldFLiAsz1zX2VwZ8Kob+QTUivqz8rET699hpFpPn255wylPAAYLKfywQ6Jun9ycY1xmCDIJo8WGYnXICHYtqloXWwS0UOyKscRFymKn4j/lKHAXT9DTN92OZ/fLYfi7sC5ZbgqvZce8dRcyqwEBcNW3SPFCAgGwpuD/zSUMfyvXrVy4DZjYtAzBBeqf6SSGmbEQ0fC3iipnwW2t+yXFCwm3Ct29RwLe7BGI/kVROANueWypTf3Q1RcXifJq7LgFTv1dMsPcmXyIv08EOYdAXVeb+KGTjufJ7SD9H+CUxyikh5HW0ojpdSkx/apm6S2w90h+KiV9cfQ==

VICTOR MANUEL HERNANDEZ VELAZQUEZ | Fecha:2023-04-24 13:37:16 | Firmante

1stsJGdKWLH+Vs0jb1uPHapstGoyAgAoEQirDVKKJPA1oC2jbfz/uKk2xcdqarkSUouZIR4VQA7qdXmG4BDCxPloFoXIMVhHwf4eR1zj1f/dlqrBsQ4G5y9cTOUbvQitAn9kNYGKmX8L43jhx6uF/ykoGRS/IEBu1ldN2hVwz+/WgsvQhRSGxzy+Nvq9K8ohAwzb0S4QZs7gpgKG4rOm0LFsDKI3znbnfZCXTskSu/Fzw12Fccj5XjDZY6FsOjI0EGUxwUj0qL5dhVLIQfHofM4DvNhmfeLIN7FTI/AF02SBwm6IMB91bfqxtntw5R9aUx1oqKBarHID1MeYI1tA==

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

z87C2jbIF



<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/O3ZJixBWjYSvuUjRf4hDOWoXoYltn4YGX>