



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

**Aislamiento y caracterización de las bacterias
simbiontes de los nemátodos entomopatógenos
Heterorhabditoides chongmingensis,
Oscheius myriophila y *Caenorhabditis brenneri*.**

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A:

IBT. KARINA CRUZ PEREZ

DIRECTOR: DR. VÍCTOR MANUEL HERNÁNDEZ VELAZQUEZ

CO-DIRECTOR: DR. IVÁN ARENAS SOSA

CUERNAVACA, MORELOS

2018



ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
ÍNDICE DE CUADROS.....	v
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Nemátodos entomopatógenos.....	3
2.2 Ciclo de vida	3
2.3 Relación mutualista nemátodo-bacteria	5
2.4 Photorhabdus y Xenorhabdus	7
2.5 Nemátodos entomopatógenos de la familia <i>Rhabditidae</i>	8
2.7 Metabolitos secundarios producidos por bacterias asociadas con nemátodos entomopatógenos.....	9
2.8 Control biológico de insectos con nematodos entomopatógenos.....	9
2.9 Cepas nativas del Estado de Morelos	11
3. JUSTIFICACIÓN.....	14
4. HIPÓTESIS.....	14
5. OBJETIVOS	14
5. 1 Objetivo general	14
5.2 Objetivos particulares	14
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
6. 1 Material biológico.....	16
6.1.1 Larvas de insectos	16
6.1.2 Nemátodos entomopatógenos <i>H. chongmingensis</i> , <i>O. myriophila</i> y <i>C. brenneri</i>	16
6.2 Propagación de los NEPs.....	16
6.3 Cuantificación de los NEPs.....	17
6.4 Extracción de las bacterias simbiotas a los NEPs	17
6.4.1 Método de maceración	17
6.4.2 Método de la hemolinfa.....	18
6.4.3 Obtención de las bacterias puras	19
6.5 Bioensayos de patogenicidad	19

6.6 Bioensayos de virulencia	20
6.7 Análisis estadísticos.....	20
6.8 Identificación bioquímica de los las baterías simbiotes de los NEPs <i>H. chongmingensis</i> , <i>O. myriophila</i> y <i>C. brenneri</i>	20
6.8.1 Tinción de Gram	21
6.8.2 Motilidad	21
6.8.3 Actividad proteasa.....	22
7. RESULTADOS	24
7.1 Propagación de los NEPs.....	24
7.2 Extracción de las bacterias simbiotes a los NEPs	24
7.2.1 Método de maceración	24
7.5 Bioensayos de patogenicidad y virulencia	27
7.6 Identificación bioquímica de los las baterías simbiotes de los NEPs <i>H. chongmingensis</i> , <i>O. myriophila</i> y <i>C. brenneri</i>	33
7.6.1 Tinción de Gram	33
7.6.2 Motilidad	34
7.6.3 Actividad proteasa.....	35
7.6.4 Actividad lecitinasa	36
7.6.5 Producción de antibióticos	38
7.7 Identificación molecular de las bacterias simbiotes de los NEPs <i>H. chongmingensis</i> , <i>O. myriophila</i> y <i>C. brenneri</i>	38
8. DISCUSIÓN	39
9. CONCLUSIONES	46
10. BIBLIOGRAFÍA	47
11. ANEXOS	60
11.1 Secuencias de ADN	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura.1 Ciclo de vida de nemátodos entomopatógenos de las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae (Tomado y modificado de Ehlers, 2001).	4
Figura 2. Localización de las bacterias dentro del NEP. A) Vesícula de nemátodo entomopatógeno <i>S. carpocapsae</i> colonizado por <i>X. nematophila</i> . B) <i>P. luminescens</i> colonizando el intestino del nemátodo entomopatógeno <i>H. bacteriophora</i> (Tomado de Ciche, et al., 2006 y Ciche, 2007).....	6
Figura 3. Ubicación de la bacteria <i>Serratia</i> sp. SCBI dentro del nemátodo <i>C. briggsae</i> cepa KT0001 (Tomado de Abebe et al., 2011).....	8
Figura 4. Extracción de hemolinfa de una larva de <i>G. mellonella</i> infectada con NEPs. 18	
Figura 5. Técnica de estría cruzada.	19
Figura 6. Colonias sembradas en placas de agar LB obtenidas de los aislamientos. A) MC2-R, B) MC2-B (aisladas de <i>H. chongmingensis</i>); C) MC5-R, D) MC5-B (aisladas de <i>O. myriophila</i>); E) DS-R y F) DS-B (aisladas de <i>C. brenneri</i>).	27
Figura 8. Porcentajes de mortalidad a las 48 horas de las cepas aisladas y los controles sobre larvas de <i>G. mellonella</i> con las diferentes concentraciones utilizadas. * Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$).	28
Figura 9. Porcentajes de mortalidad de las cepas aisladas y los controles sobre larvas de <i>G. mellonella</i> infectadas por herida con un inóculo de 1×10^5 células (Media \pm error estándar). No se encuentran diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p > 0.4029$).	29
Figura 10. Cadáveres de <i>G. mellonella</i> infectadas con los diferentes aislados obtenidos. A) MC2-R, B) MC2-B, C) MC5-R, D) MC5-B, E) DS-R, F) DS-B, G) <i>S. marcescens</i> , H) <i>E. coli</i> , I) larva sana.	30
Figura 11. Porcentajes de mortalidad de las cepas aisladas y los controles sobre larvas de <i>T. molitor</i> con las diferentes concentraciones utilizadas (Media \pm error estándar). * Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$).	31
Figura 12. Cadáveres de <i>T. molitor</i> infectados con los diferentes aislados obtenidos. A) MC2-R, B) MC2-B, C) MC5-R, D) MC5-B, E) DS-R, F) <i>S. marcescens</i> , G) <i>E. coli</i> , H) larva sana.....	33

Figura 13. Tinción de Gram de los diferentes aislados. Siendo Gram negativos A) MC2-R, B) MC2-B, C) MC5-R, D) MC5-B, E) DS-R y F) DS-B Gram positivo..... 34

Figura 14. Resultados de las pruebas de motilidad, donde en los resultados positivos se observa un halo alrededor del sitio de inoculación. A) MC2-R, B) MC2-B, C) MC5-R, E) DS-R, F) DS-B (Positivos), D) MC5-B tuvo un resultado negativo, G) *S. marcescens* control positivo y H) *K. pneumoniae* control negativo..... 35

Figura 15. Resultados de actividad proteasa. A) MC2-R, B) MC2-B, C) MC5-R, D) MC5-B, E) DS-R y F) DS-B son positivos ya que observa la licuefacción del medio gelatina nutritiva. G) Control positivo *S. marcescens* y H) Control negativo *E. coli*. 36

Figura 16. Resultados de actividad lecitinasa. A) MC2-R, C) MC5-R, E) DS-R, G) MC2-B y K) DS-B a las 48 h; B) MC2-R, D) MC5-R, F) DS-R, H) MC2-B y L) DS-B a las 96 h, dichos aislados muestran actividad lecitinasa. MC5-B a las I) 48 h, J) 96 h no presenta actividad lecitinasa. M) *S. marcescens* control positivo y N) *E. coli* control negativo a las 96 horas..... 37

Figura 17. Gel de agarosa al 1% donde se observan los productos de la PCR. Los fragmentos amplificados tienen un tamaño aproximado de 1350 pb. 1) Marcador de peso molecular, 2) MC2-R, 3) MC5-R, 4) DS-R, 5) MC2-B, 6) MC5-B, 7) DS-B y 8) *S. marcescens*..... 38

Figura 18. Resultados obtenidos del BLAST. A) MC5-R, B) DS-R, C) MC2-B D) DS-B. 39

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Plagas de importancia agrícola controladas con nemátodos de la familia Steinernematidae y Heterorhabditidae.....	11
Cuadro 2. Medio de cultivo semisólido.....	21
Cuadro 3. Medio de cultivo de gelatina nutritiva	22
Cuadro 4. Agar nutritivo	22
Cuadro 5. Número de colonias obtenidas a partir del método de maceración.....	25
Cuadro 6. Número de colonias obtenidas a partir del método de la hemolinfa.....	26
Cuadro 7. DL ₅₀ de los aislados obtenidos.	32

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARNr	Ácido Ribonucleico ribosomal
ANOVA	Análisis de varianza
BLAST	Herramienta básica de búsqueda de alineación local
CL50	Concentración letal 50
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
cm	Centímetros
g	Gramos
h	Horas
Jl	Juvenil Infeccioso
LB	Luria-Bertani
ml	Mililitros
mm	Milímetros
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
NEPs	Nemátodos entomopatógenos
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
μl	Microlitros

1. INTRODUCCIÓN

De acuerdo con las estimaciones de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), las plagas y las enfermedades de las plantas tienen serias repercusiones en la producción de alimentos. Todos los años la producción agrícola mundial se reduce entre un 20 al 40 % a causa de estas plagas y enfermedades, mientras que un 10% de las cosechas se destruye por roedores e insectos en los lugares de almacenamiento (Agro-Bio, 2014).

Para el control de plagas agrícolas se ha llevado a cabo la elaboración y aplicación desordenada de sustancias químicas, sin embargo, se considera que la aplicación sistemática de estas sustancias origina trastornos notables en el ambiente, la salud humana y el desarrollo de resistencia de plagas (González y Bernal, 2000).

Una alternativa para el uso de productos químicos es el control biológico, el cual consiste en el uso de enemigos naturales para el control de plagas; entre estos organismos se pueden encontrar a los hongos, bacterias, virus, insectos y nemátodos (Guédez *et al.*, 2008).

Los nemátodos entomopatógenos (NEPs) son parásitos obligados de insectos, con un amplio rango de hospederos tales como lepidópteros, coleópteros y dípteros (Haukeland, 1993; Burnell y Stock, 2000). Éstos son seguros para los mamíferos y para las plantas (Poinar, 1989, Boemare *et al.*, 1996) y tienen compatibilidad con varios agroquímicos (Rovesti y Deseo, 1990; Grewal, 1999). Los nemátodos entomopatógenos de las familias *Steinernematidae* y *Heterorhabditidae* son los más estudiados. La virulencia de los NEPs se debe a la asociación mutualista con bacterias de los géneros *Xenorhabdus* y *Photorhabdus*, las cuales son los agentes primarios responsables de matar al insecto huésped dentro de un rango de 24 a 48 horas (Adams y Nguyen, 2002). Estas bacterias se encuentran asociadas con las familias *Steinernematidae* y *Heterorhabditidae* respectivamente (Boemare *et al.*, 1993; Adams y Nguyen, 2002).

En el presente trabajo se realizará el aislamiento y la identificación de las bacterias asociadas a tres especies de nemátodos entomopatógenos:

Heterorhabditoides chongmingensis, *Oscheius myriophila* y *Caenorhabditis brenneri*
aisladas previamente en el estado de Morelos.

2. ANTECEDENTES

2.1 Nemátodos entomopatógenos

El Phylum Nematoda (= Nemata) es uno de los más diversos y versátiles del reino animal, con un número estimado de más de 100, 000 especies (Coomans, 2000; De Ley, 2000). Este reino ha logrado colonizar los ambientes más diversos y variados como: tundras, desiertos, ambientes marinos y de agua dulce, aguas termales y aguas congeladas (Stock, 1998).

Los nemátodos son gusanos no segmentados, su tamaño varía desde 0.1 mm a varios centímetros de longitud, son denominados como gusanos cilíndricos, poseen una cutícula exterior acelular bajo la cual se encuentran la epidermis seguida por fibras musculares longitudinales. Estos tienen sistema excretor, nervioso, digestivo, reproductor y muscular (Kaya y Stock, 1997).

Se consideran ocho familias de nematodos promisorias para el control biológico de insectos, estas son: Tetradonematidae, Mermithidae, Allantonematidae, Neotylenchidae, Sphaerularidae, Aphelenchidae, Heterorhabditidae y Steinernematidae, siendo las dos últimas las más estudiadas como posibles agentes de control biológico (De Ley y Blaxter, 2002).

Los nemátodos entomopatógenos (NEPs) de las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae son parásitos obligados de un gran número de especies de insectos (Poinar, 1979), y pueden parasitar cada uno de los estadios (larva, prepupa, pupa y adulto) de los insectos hospederos (Kaya y Hara, 1981) y son seguros para plantas, organismos no blanco y mamíferos debido a que son específicos para insectos, lo que les confiere una característica importante para ser utilizados dentro del control biológico de insectos plagas (Gaugler y Kaya, 1990; Poinar, 1990; Nicholls, 2008; Sotelo et al., 2013). Se caracterizan por vivir en mutualismo con bacterias de la familia Enterobacteriaceae, del género *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* respectivamente (Kaya y Gaugler, 1993; Boemare et al., 1993).

2.2 Ciclo de vida

El ciclo de vida es igual para nemátodos de las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae (Fig.1). Éstos presentan un ciclo de vida caracterizado principalmente

por seis estados de desarrollo: huevo, cuatro instares de estados juveniles (conocidos también como “dauer”) y adulto (hembra, macho o hermafrodita según el género) (Wouts, 1991). Sin embargo, en el caso de la familia Steinernematidae incluye dos ciclos amfimícticos (sexuales) dentro del hospedero, mientras que la familia Heterorhabditidae su ciclo es heterogónico, con hembras hermafroditas en la primera generación (Poinar, 1990).

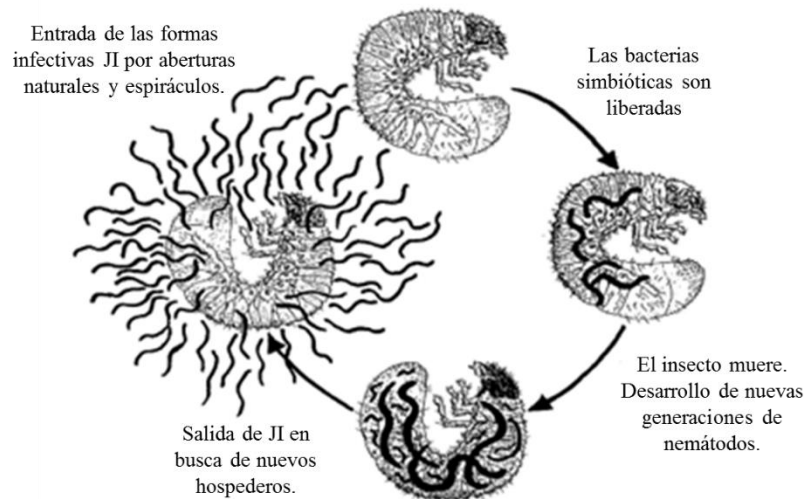


Figura.1 Ciclo de vida de nemátodos entomopatógenos de las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae (Tomado y modificado de Ehlers, 2001).

El tercer estado juvenil o juvenil infectivo (JI) es el responsable de localizar e invadir a los insectos para después introducirse en el mismo por sus aberturas naturales (ano, boca y espiráculos) (Tanada y Kaya, 1993; Grewal y Georgis, 1999), o a través de las partes suaves del integumento (Peters y Ehlers, 1994). En el caso de los JI de los heterorabditidos también pueden penetrar el insecto raspando la cutícula del insecto, debido a que poseen una estructura de queratina que se asemeja a un pequeño diente (Poinar, 1976).

Cuando el JI entra al hemocele del insecto libera la bacteria, en el caso de *Steinernema* libera a *Xenorhabdus* dentro del NEP por defecación y *Heterorhabditis* regurgita a *Photorhabdus* (Ciche y Ensign, 2003), las cuales se multiplican rápidamente y matan al insecto por septicemia entre las 24 y 48 horas posteriores a la entrada del JI (Adams y Nguyen, 2002). Los nemátodos se reproducen en el cadáver del insecto

alimentándose de la biomasa bacteriana y de los tejidos del insecto metabolizados por la bacteria (Boemare, 2002).

La reproducción del nemátodo continua hasta que la reserva de alimento que proporciona el hospedero es suficiente para continuar con un nuevo ciclo (usualmente se puede presentar hasta tres generaciones amfimícticas dentro del mismo insecto). 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).

Los JI están adaptados para sobrevivir por largos periodos en el suelo, cubierto por la cutícula del segundo estadio, la cual protege a los nemátodos de la desecación y otro tipo de estrés ambiental (dicha cutícula se pierde durante la penetración en un nuevo insecto hospedero) (Campbell y Gaugler, 1991). Su metabolismo se reduce al mínimo, su tracto digestivo está colapsado y la boca y el ano se encuentran cerrados (posiblemente para limitar la pérdida de agua o el acceso a patógenos) (Adams y Nguyen, 2002; Poinar, 1990).

2.3 Relación mutualista nemátodo-bacteria

Los nemátodos esteinernematidos y heterorhabditidos son considerados como entomopatógenos por su relación mutualista con las bacterias del género *Xenorhabdus* y *Photorhabdus*, respectivamente, debido a que cada uno requiere del otro para que proliferen en detrimento del insecto huésped (Poinar y Thomas, 1966; Poinar *et al.*, 1977); cada especie de nemátodo tiene una asociación específica con solo una especie de bacteria, sin embargo varias especies de nemátodos pueden estar asociados con la misma bacteria (Akhurst y Boemare, 1990).

El nemátodo emplea a la bacteria como ayuda para superar las defensas humorales y celulares del hospedero, para proteger al cadáver del insecto contra microorganismos saprofitos y como sustrato para el crecimiento y su reproducción, mientras que las bacterias a su vez utilizan al nemátodo como vector para su liberación en el hemocele del insecto y 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 (Poinar y Thomas, 1966; Poinar et al., 1977; Grewal et al., 1997; Han y Ehlers, 1998).

El JI se alimenta de la bacteria conservándola en un receptáculo presente en la unión entre el esófago y el intestino, conocida como vesícula (esteinernematidos), o en el lumen del intestino (heterorhabditidos) (Fig. 2) (Grewal et al., 1997).

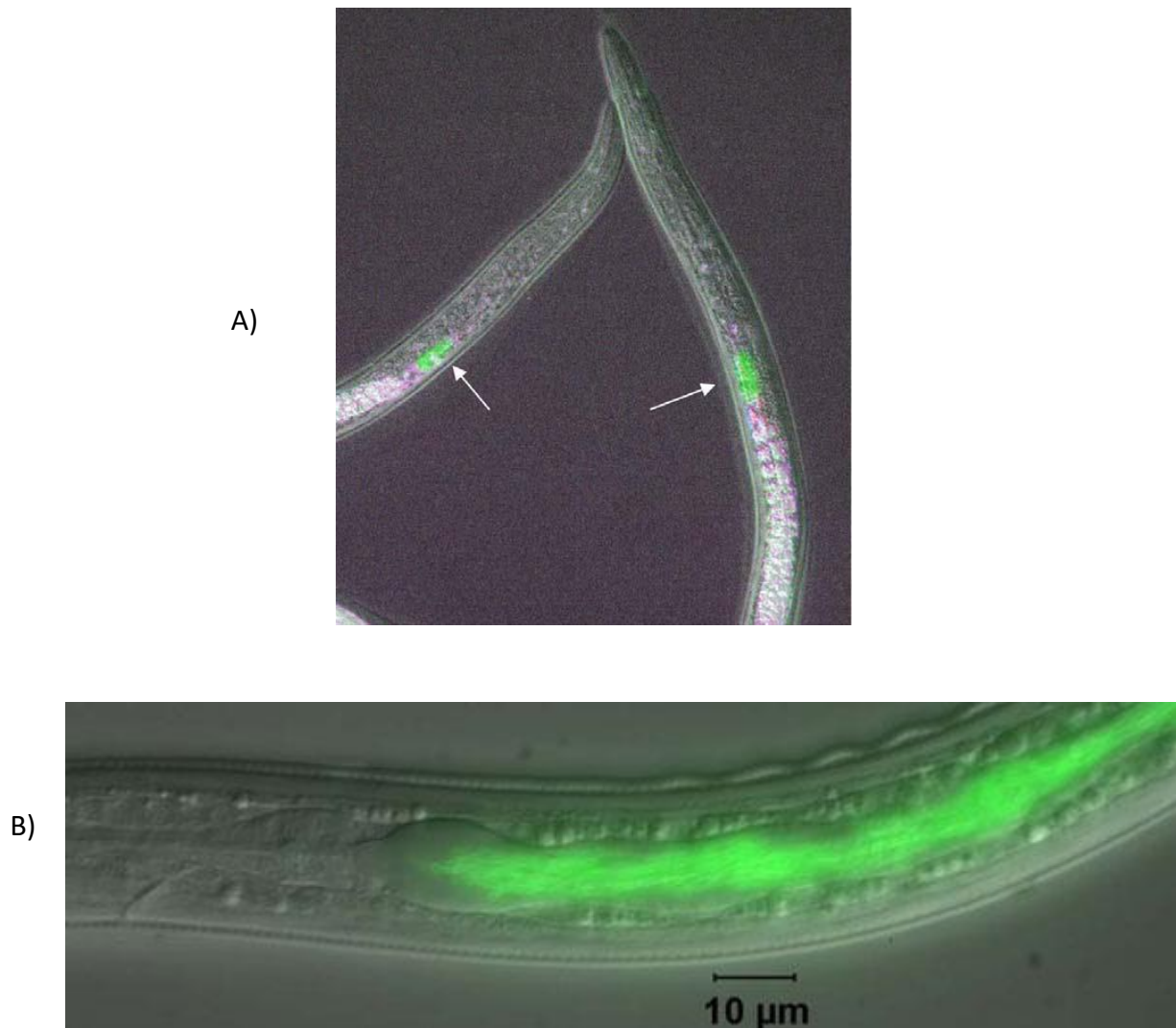


Figura 2. Localización de las bacterias dentro del NEP. A) Vesícula de nemátodo entomopatógeno *S. carpocapsae* colonizado por *X. nematophila*. B) *P. luminescens* colonizando el intestino del nemátodo entomopatógeno *H. bacteriophora* (Tomado de Ciche, et al., 2006 y Ciche, 2007).

El complejo nemátodo bacteria muestra un gran potencial como un agente de control biológico de insectos nocivos debido a que *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* son

especies altamente patógenas a varias especies de insectos (Dunphy y Webster, 1988, Klein, 1990).

2.4 *Photorhabdus* y *Xenorhabdus*

Photorhabdus y *Xenorhabdus* spp. son bacterias Gram negativas móviles que pertenecen a la familia Enterobacteriaceae (Akhurst, 1980; Boemare y Akhurst, 1988; Boemare et al., 1993), son anaerobias facultativas y no forman esporas (Ruiu, 2015).

Estas dos bacterias presentan una variación fenotípica caracterizada por fases. La fase I que está asociada de manera natural con los JI y de insectos infectados por NEPs, la fase II a veces es encontrada durante las últimas etapas del desarrollo de nemátodos en cadáveres de insectos y durante el subcultivo de la fase I (Akhurst, 1980). La fase II tiene un tamaño celular más pequeño y una morfología diferente en las colonias, las células no son móviles y carecen de una variedad de proteínas de secreción y también de metabolitos secundarios (Boemare y Arkhurst, 1988; Smigielski et al., 1994, Forst y Clarke, 2002). Las bacterias del género *Photorhabdus* spp. no interactúa simbióticamente con el nemátodo, pero siguen siendo patógena (Akhurst, 1980). En el caso de *Xenorhabdus* la fase II puede volver a la fase I, mientras que en *Photorhabdus* no se presenta este cambio. Otra diferencia entre estos dos géneros es que *Photorhabdus* tiene la capacidad de emitir luz en condiciones de cultivo en fase estacionaria y en el insecto huésped infectado (Poinar et al., 1980), y *Xenorhabdus* es catalasa negativa.

Photorhabdus y *Xenorhabdus* spp. pueden crecer como organismos libres bajo condiciones de laboratorio estándar, a medida que las bacterias entran en la fase estacionaria de su ciclo de crecimiento (se encuentran en la fase I), secretan diversos productos extracelulares tales como: lipasas, fosfolipasas, proteasas y diferentes antibióticos de amplio espectro (Akhurst, 1982; Akhurst y Boemare, 1990; Boemare y Akhurst, 1988; Neilson, et al., 1990). Además, producen dos tipos de productos de inclusión cristalina (Cips) que representan más del 40% de la proteína celular (Bowen y Ensign, 2001; Couche y Gregson, 1987). Cada tipo de Cip está compuesto por un polipéptido de alto número de aminoácidos esenciales, pero son de masas diferentes

en ambos géneros (Bintrim y Ensign, 1998; Bowen y Ensign, 2001; Couche y Gregson, 1987).

2.5 Nemátodos entomopatógenos de la familia *Rhabditidae*

En los últimos años, otras especies de nemátodos han mostrado que utilizan una bacteria patógena para parasitar insectos hospederos. Algunos ejemplos de estas especies son *Heterorhabditoides (Oscheius) chongmingensis* y *Caenorhabditis briggsae* los cuales han sido identificados como potenciales patógenos de insectos (Nguyen y Hunt, 2007; Bedding y Akhurts, 1975; Zhang *et al.*, 2008; Ye *et al.*, 2010; Abebe *et al.*, 2010).

Ambas especies están asociadas con una bacteria entomopatógena del género *Serratia*, y requieren de sus simbioses bacterianos para que causen la muerte del hospedero, para que crezcan y se reproduzcan dentro del cadáver del insecto, y emerger del cadáver de insecto como JI (Zhang *et al.*, 2008; Ye *et al.*, 2010; Abebe *et al.*, 2010; Torres- Barragán *et al.*, 2011).

Abebe *et al.*, en el 2011 reportaron la relación entre el nemátodo *C. briggsae* cepa KT0001 y la bacteria *Serratia* sp. SCBI (South African *Caenorhabditis briggsae* isolate) y que fue capaz de matar al insecto *Galleria mellonella*. De igual manera se demostró que *Serratia* sp. SCBI estaba presente en el intestino del nemátodo, de una manera similar al complejo *Heterorhabditis-Photorhabdus* (Fig. 3)

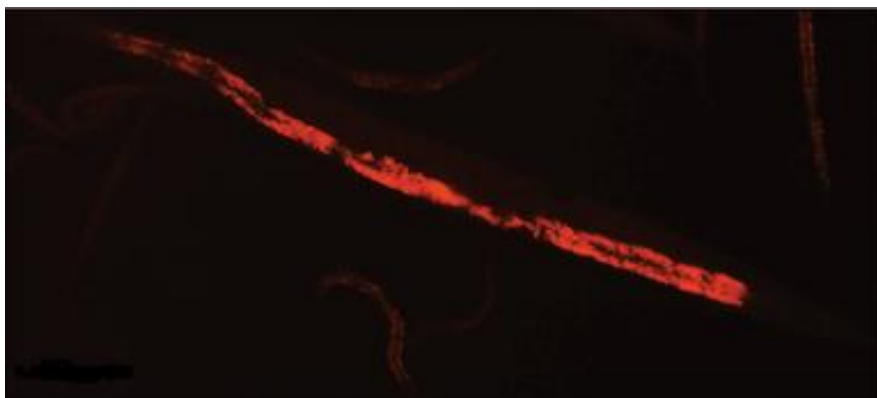


Figura 3. Ubicación de la bacteria *Serratia* sp. SCBI dentro del nemátodo *C. briggsae* cepa KT0001 (Tomado de Abebe *et al.*, 2011).

2.7 Metabolitos secundarios producidos por bacterias asociadas con nemátodos entomopatógenos

Otro enfoque que se les puede dar a los métodos de control alternativos a los productos químicos es la evaluación de microorganismos, así como los compuestos bioactivos que producen (Orozco *et al.* 2016). Un ejemplo es *Photorhabdus* ya que es capaz de producir moléculas que inhiben la respuesta inmune del insecto, así como de otros microorganismos e incluso pueden causar su muerte en aquellos que intentan invadir el cadáver del insecto (Poinar y Thomas, 1966; Akhurst, 1982; Boemare *et al.*, 1993; Demain y Fang, 2000; Kontnik *et al.*, 2010). Los metabolitos secundarios de este género bacteriano tienen potencial para la bioprospección farmacéutica y agrícola. En un estudio llevado a cabo por Orozco *et al.* en el 2016 evaluaron la bioactividad de extractos crudos de *P. luminescens sonorensis* (Stock *et al.*, 2009) contra plagas de importancia agrícola.

Sin embargo, se han encontrado otros usos a estos metabolitos secundarios además del control de plagas. Tal es el caso de *Bacillus cereus*, aislado de un NEP del género *Rhabditis*, se ha encontrado que produce una dicetopiperacina microbiana llamada ciclo (L-Pro-D-Arg), la cual presenta actividad antibacteriana contra diferentes bacterias patógenas tanto Gram positivas como Gram negativas, de igual manera se ha encontrado que presentan actividad antitumoral contra células Hella, y se ha demostrado que no tiene actividad citotóxica contra células normales de riñón de mono (VERO) (Kumar *et al.*, 2014a). Para el caso de *Comamonas testosteroni*, una especie bacteriana asociada con un nemátodos del género *Rhabditis (Oscheius)* sp., se han encontrado diversos compuestos los cuales presentan actividad antibacteriana contra bacterias patógenas a humanos entre las que destacan *Vibrio cholerae* y *Salmonella typhi*, dicha actividad es incluso más efectiva comparada con los antibióticos ciprofloxacina y ampicilina (Kumar *et al.* 2014b).

2.8 Control biológico de insectos con nematodos entomopatógenos

El uso indiscriminado de insecticidas para el control de plagas provoca la selección de nuevas resistencias a los insecticidas en las poblaciones de plagas, el resurgimiento de las poblaciones tratadas, residuos y riesgos al medio ambiente,

destrucción de especies benéficas, alto costo de fumigantes, en equipo, mano de obra y material (Stock *et al.*, 2000; Badii y Abreu, 2016).

Una alternativa al uso de productos químicos es el control biológico, el cual consiste en el uso de organismos vivos (enemigos naturales) para reducir la densidad de la población de uno o más organismos plaga (Van Driesche *et al.*, 2007). Los enemigos naturales se clasifican en parasitoides, depredadores y patógenos; en este último grupo se incluyen a los hongos, bacterias, virus, nemátodos y protozoarios (Bahena, 2008).

Los nemátodos entomopatógenos poseen la capacidad de búsqueda de los depredadores y parásitos, son altamente virulentos matando rápidamente a sus hospedadores, pueden ser producidos fácilmente *in vitro*, poseen un alto potencial reproductivo, tienen un amplio rango de hospedadores y la inocuidad a mamíferos en general y para el resto de la fauna (Kaya y Gaugler, 1993; Glazer y Lewis, 2000). Es gracias a estas características que se han utilizado como agentes de control biológico de manera comercial para la supresión de plagas de importancia económica de una amplia variedad de plagas de insectos como se muestra en el Cuadro 1, donde se mencionan algunos insectos plaga, el cultivo que afectan y las especies de NEPs utilizadas para su control (Ehlers, 1996; Hazir *et al.*, 2003).

Cuadro 1. Plagas de importancia agrícola controladas con nemátodos de la familia Steinernematidae y Heterorhabditidae.

Insecto plaga	Nombre científico	Cultivo	Nemátodo entomopatógeno
Gusano blando del césped	<i>Phyllopertha horticola</i>	Pastos y césped	<i>H. bacteriophora</i>
Gorgojo de la vid	<i>Otiorhynchus sulcatus</i>	Plantas y frutas ornamentales de viveros	
Gorgojo del olivo	<i>O. cribricollis</i>	Olivo	
Picudo negro	<i>Scyphophorus interstitialis</i>	Agave pulquero, tequilero, mezcalero	
Escaltelas	<i>Scatella stagnalis</i>	Tomate, plantas en invernaderos	<i>S. feltiae</i>
Trips	Orden: Thysanoptera	Hortalizas	
Mosca minadora	<i>Liriomyza huidobrensis</i>	Papa	
Picudo negro	<i>Scyphophorus interstitialis</i>	Agave pulquero, tequilero, mezcalero	
Gorgojo de la vid	<i>O. sulcatus</i>	Plantas y frutas ornamentales de viveros	
Polilla	<i>Platyptilia carduidactyla</i>	Alcachofa	<i>S. carpocapsae</i>
Gorgojo del pino	<i>Hylobius abietis</i>	Coníferas	
Gusano cabezudo	<i>Capnodis tenebrionis</i>	Árboles frutales	
Gorgojo de la vid	<i>O. sulcatus</i>	Plantas y frutas ornamentales de viveros	<i>S. kraussei</i>

2.9 Cepas nativas del Estado de Morelos

En el 2014, Castro aisló tres especies de nemátodos entomopatógenos en cultivos de caña de azúcar, realizó la identificación morfológica y morfométrica, así como una determinación de la virulencia de las mismas sobre el lepidóptero *Diatraea magnifactella*.

Para el caso de la cepa denominada como MC2, ésta presentó un 98% de identidad en cuanto a su secuencia del 16S con el nemátodo *Heterorhabditoides chongmingensis*, el cual fue aislado de suelo franco arenoso (pH de 7.98) en Tepalcingo, Morelos y presenta una CL₅₀ de 19.6 juveniles infectivos sobre *D. magnifactella*.

La cepa denominada MC5 tuvo 94% de identidad en su secuencia del 16S con el nemátodo *Oscheius myriophila*. Ésta fue aislada de suelo franco arenoso (pH de 6.8) en Tepalcingo, Morelos y tuvo una CL₅₀ de 21.4 JI sobre *D. magnifactella*.

La cepa denominada DS tiene un 98% de identidad en cuanto a su secuencia del 16S con el nemátodo *Caenorhabditis brenneri*, en este caso el nemátodo fue aislado directamente de una larva de *D. magnifactella* y tiene una CL₅₀ de 16 JI sobre esta misma.

Estas especies de nemátodos fueron aisladas por el laboratorio de Control Biológico del Centro de Investigación en Biotecnología.

Para estas tres cepas se llevaron a cabo 2 estudios. El primero de ellos realizado por Guadarrama en 2015, donde se buscó la respuesta de mortalidad de las tres cepas de nemátodos y su capacidad infectiva sobre larvas de *D. magnifactella*, después de ser expuestos a diferentes agroquímicos (bunsan®, monitor 600®, faena®, ridomil® y talstar®) utilizados regularmente en la industria agrícola. Teniendo como resultados, que las tres cepas mostraron un mayor porcentaje de mortalidad con el fungicida bunsan®, mientras que las cepas *O. myriophila* y *H. chongmingensis* muestran un menor porcentaje de mortalidad con el insecticida talstar® y para *C. brenneri* fue con el insecticida monitor®. El estudio de la capacidad infectiva sólo se llevó a cabo con la cepa *O. myriophila*, encontrando 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 nemátodos por larva para cada cepa).

El segundo estudio realizado fue la producción *in vivo* de las tres cepas antes mencionadas, donde se evaluó la producción de JI por larva de *G. mellonella* a diferentes concentraciones de inóculo (10, 30 y 50 JI), así como la tasa de reproducción para cada caso, encontrando que en cuanto a la producción de NEPs no hay diferencias

significativas entre las tres cepas, para cada uno de los inóculos, mientras que para el caso de la tasa de reproducción, ésta es mayor a partir de un inóculo de 10 JI, y la menor a partir de 50 JI (Cruz, 2015).

3. JUSTIFICACIÓN

Los nemátodos entomopatógenos se han destacado como agentes de control biológico debido a su relación mutualista con bacterias. Los NEPs están relacionados generalmente con una sola especie de bacteria, por lo que es necesario aislarla y caracterizarla, ya que ésta es necesaria para que se pueda llevar a cabo la producción *in vitro* del nemátodo con que esté asociada, así como para estudiar la posible fuente de metabolitos secundarios, no solo para aquellos de interés agrícola, también para aplicaciones en la salud humana.

El presente trabajo permitirá la caracterización de las bacterias simbiotes de los NEPs *Heterorhabditoides chongmingensis*, *Oscheius myriophila* y *Caenorhabditis brenneri* previamente aislados en el Estado de Morelos y que fueron reportadas por primera vez en América.

4. HIPÓTESIS

Dado que cada familia de nemátodos entomopatógenos tiene relación mutualista con un género de bacterias diferente y que las especies *Heterorhabditoides chongmingensis*, *Oscheius myriophila* y *Caenorhabditis brenneri* previamente aislados pertenecen a la familia *Rhabditidae*, se espera que las bacterias aisladas estén asociadas a bacterias del género *Serratia*.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Aislar y caracterizar a las bacterias simbiotes de los nemátodos entomopatógenos *Heterorhabditoides chongmingensis*, *Oscheius myriophila* y *Caenorhabditis brenneri*.

5.2 Objetivos particulares

- Aislar la bacteria simbiote de los nemátodos entomopatógenos *Heterorhabditoides chongmingensis*, *Oscheius myriophila* y *Caenorhabditis brenneri*.
- Realizar evaluaciones de patogenicidad y virulencia sobre larvas de *Galleria mellonella* y *Tenebrio molitor* de las bacterias aisladas de los nemátodos entomopatógenos.

- Identificar la especie de las bacterias aisladas de las cepas de nemátodos entomopatógenos mediante pruebas bioquímicas.
- Identificar la especie de las bacterias aisladas de los nemátodos entomopatógenos mediante técnicas de biología molecular.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material biológico

6.1.1 Larvas de insectos

Se utilizaron larvas de 4° y 5° estadio de *G. mellonella* y de *T. molitor*. Dichas larvas fueron obtenidas de las crías mantenidas en el Laboratorio de Control Biológico del CEIB-UAEM. Las larvas se alimentaron con dieta merídica durante la realización de los bioensayos y se mantuvieron a una temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$.

6.1.2 Nemátodos entomopatógenos *H. chongmingensis*, *O. myriophila* y *C. brenneri*

Se utilizaron los NEPs *H. chongmingensis*, *O. myriophila* y *C. brenneri* (aislados MC2, MC5 y DS respectivamente) proporcionados por el Laboratorio de Control Biológico del CEIB-UAEM.

6.2 Propagación de los NEPs

Para la propagación de las tres cepas de NEPs, se utilizaron larvas de *G. mellonella* de 4° o 5° estadio, para ello se prepararon cámaras de inoculación constituidas por cajas Petri de 100 x 15 milímetros (mm) en donde se colocaron 5 larvas de *G. mellonella* y 1 mililitro (ml) de una solución madre de nemátodos, se incubaron a temperatura ambiente.

A las 48 horas posteriores a la infección, las larvas muertas que presentaron características correspondientes a la muerte causada por NEPs (apariencia flácida y cambio de coloración) se separaron para su desinfección, esto se llevó a cabo en una solución de Cloro al 5% y se realizaron tres enjuagues posteriores con agua destilada estéril (Woodring y Kaya, 1988). Una vez realizado el procedimiento se depositaron en trampas White.

Las trampas White (Kaya y Stock, 1997) consistieron en una tapa de caja Petri de 60 x 15 mm de diámetro incluida dentro de una caja petri de 100 x 15 mm de diámetro; posteriormente, sobre la caja petri de menor tamaño se colocó un círculo de papel filtro Whatman No. 1 de 10 centímetro (cm) de diámetro en el cual se depositaron las larvas desinfectadas para después agregar 5 ml de agua destilada estéril. Se incubó durante 10 días a temperatura ambiente para la posterior colecta de nemátodos.

La colecta se llevó a cabo realizando varios lavados con agua destilada estéril de la Trampa White, la solución madre obtenida fue depositada en frascos de cultivo celular Corning® Flash de 50 ml, y se agregó agua destilada estéril hasta obtener un volumen de 20 ml. Los frascos se conservaron a una temperatura de $12 \pm ^\circ\text{C}$ sin cerrarlos completamente para su aireación (Woodring y Kaya, 1988).

6.3 Cuantificación de los NEPs

La cuantificación de nemátodos se llevó a cabo con las suspensiones obtenidas de las Trampas White. La suspensión se homogeneizó y se obtuvo una alícuota de 100 microlitros (μl), la cual se colocó sobre una caja Petri para cuantificar los NEPs presentes en la alícuota utilizando el microscopio estereoscópico, lo cual permitió conocer la concentración de nemátodos de la solución madre original, mediante la fórmula expuesta por Woodring y Kaya (1998):

$$A = \frac{DxC}{B}$$

Donde:

A = Mililitros de la suspensión (concentración conocida) para ser diluida.

B = Número de nemátodos/ml de la suspensión a diluir.

C = Volumen final en mililitros de la nueva dilución.

D = Concentración deseada en la nueva dilución.

6.4 Extracción de las bacterias simbiotas a los NEPs

Para la extracción de las bacterias simbiotas de las tres cepas de NEPs, se realizaron dos métodos de extracción, estos fueron: el método de maceración y el método de hemolinfa.

6.4.1 Método de maceración

Para realizar este método se obtuvieron 60,000 JI emergidos de la trampa White para cada una de las cepas, los cuales fueron distribuidos en tubos de centrifuga Falcon® de 40 ml quedando 20,000 en cada uno. Posteriormente, se centrifugaron a 1,000 revoluciones por minuto (rpm) durante 7 minutos.

El sobrenadante de los tres tubos se desechó y uno de ellos fue reservado para macerarlo posteriormente. El segundo de los tubos se lavó con agua destilada estéril y se centrifugó bajo las condiciones antes mencionadas, el sobrenadante se desechó, el precipitado se reservó. Los nemátodos del tubo restante fueron desinfectados con una disolución de hipoclorito de sodio al 5%, y se realizaron tres lavados posteriores a la desinfección con agua destilada estéril (Lee y Stock, 2010).

Los JI fueron macerados en un mortero con pistilo por un periodo de 30 minutos, se tomó una alícuota y se sembró en medio de cultivo Luria-Bertani (LB) y HCT sólidos (Arias y Murillo, 2013).

6.4.2 Método de la hemolinfa

Se infectaron 10 larvas de *G. mellonella* de 5° estadio con 1ml de solución madre de nemátodos para cada una de las cepas, a las 48, 72 y 96 h posteriores a la infección, las larvas con características correspondientes a la muerte causada por NEPs fueron seleccionadas y su superficie se desinfectó con alcohol al 70% por 10 minutos, se dejaron secar durante dos minutos dentro de la campana de flujo laminar (Woodring y Kaya, 1998). Posteriormente, con la ayuda de una aguja para insulina de 1 ml se extrajo la hemolinfa, insertando la aguja entre el 6° y 7° inter segmento de la larva (Fig. 4) (Arias y Murillo, 2013). La alícuota tomada se sembró en medio de cultivo LB y HCT sólidos.



Figura 4. Extracción de hemolinfa de una larva de *G. mellonella* infectada con NEPs.

6.4.3 Obtención de las bacterias puras

Las placas se incubaron durante 24 horas, todas las colonias observadas fueron seleccionadas y se estriaron cajas para separar las colonias presentes y dejarlas puras. Para esto se realizó la técnica de estría cruzada (Fig.5) la cual consistió en tomar una asada de la colonia que se quería separar (el asa bacteriológica se flameó previamente) y se hizo una serie de estrías en una nueva placa de agar, posteriormente se flameó el asa, tocando solo una o dos veces las estrías anteriores se realizó una nueva serie en ángulo recto a las primeras, el proceso de flamear y estriar se llevó a cabo una vez más y se incubó la caja a 27 °C durante 24 horas. Este procedimiento se realizó hasta obtener colonias puras.

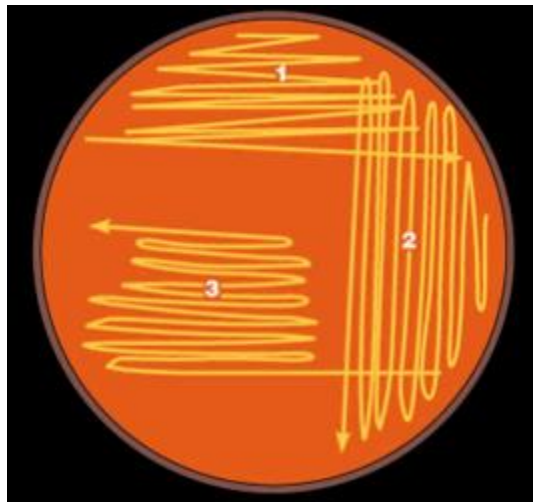


Figura 5. Técnica de estría cruzada.

6.5 Bioensayos de patogenicidad

Los bioensayos de patogenicidad de las bacterias aisladas de cada una de las especies de NEPs se llevaron a cabo por triplicado sobre 10 larvas de 5° estadio de *G. mellonella* y *T. molitor*, llevándose a cabo tres réplicas, los tratamientos consistieron en infectar a las larvas por medio de inyección y herida. Los aislados bacterianos fueron cultivadas en medio LB sólido durante 18 horas a una temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$.

La superficie de las larvas será desinfectada previamente con alcohol al 70%. Y se procedió a la inoculación con 10 μl de la suspensión bacteriana a una concentración de 1×10^5 células para cada uno de los tratamientos. Como control positivo se utilizó la

bacteria *S. marcescens*, mientras que como controles negativos se utilizaron una cepa de *Escherichia coli* ATCC y agua destilada estéril.

Las larvas se colocaron en cajas Petri de 60 x 15 mm con dieta merídica para el caso de *G. mellonella*, mientras que para *T. molitor* se usó avena estéril como dieta. El porcentaje de mortalidad y el cambio de coloración de la cutícula se evaluaron a las 24 y 48 horas.

6.6 Bioensayos de virulencia

Los bioensayos de virulencia de las bacterias aisladas de cada una de las cepas de NEPs se realizaron sobre 30 larvas de 5° estadio de *G. mellonella* y *T. molitor*, el tratamiento fue realizado por triplicado. Las cepas de bacterias fueron cultivadas en medio LB sólido durante 18 horas a una temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$, se utilizaron cuatro concentraciones en el caso de *G. mellonella* para determinar la virulencia (10^5 , 10^3 , 50 y 5 células) y tres para *T. molitor* (10^5 , 10^4 y 10^3 células). La superficie de las larvas fue desinfectada previamente con alcohol al 70%. Se utilizaron los mismos controles positivos y negativos mencionados con anterioridad.

Las larvas se colocaron en cajas Petri de 60 x 15 mm con papel filtro estéril con dieta merídica para *G. mellonella* y avena estéril para *T. molitor*. El porcentaje de mortalidad y el cambio de coloración de la cutícula se evaluó a las 24, 48 horas.

6.7 Análisis estadísticos

Los resultados fueron sometidos análisis de varianza (ANOVA), y la prueba de Tukey al 0.05 de probabilidad. Se utilizó el paquete estadístico SAS.

6.8 Identificación bioquímica de los las bacterias simbiotes de los NEPs *H. chongmingensis*, *O. myriophila* y *C. brenneri*.

La identificación de las bacterias aisladas de las tres cepas de NEPs, se realizó con tinción de Gram, pruebas de motilidad, actividad proteasa y lecitinasa y producción de antibióticos sugeridas por Boemare *et al.* (1997) y Akhurst (1980).

6.8.1 Tinción de Gram

La tinción de Gram se realizó siguiendo la metodología de Hucker (Doetsch, 1981). Se emplearon cultivos bacterianos crecidos en medio LB sólido durante 2 días a $28 \pm 2^\circ\text{C}$.

La metodología que se siguió es la siguiente: se realizó un frotis para cada una de las bacterias aisladas, para esto se usó un portaobjetos limpio donde se colocó una pequeña gota de agua. Con un asa bacteriológica previamente flameada se obtuvo una pequeña cantidad del cultivo bacteriano y fue transferido a la gota de agua donde con la ayuda del asa se formó una suspensión homogénea, esto se realizó en condiciones asépticas. Una vez que la muestra estuvo seca se fijó con calor y se tiñó con cristal violeta, se dejó actuar durante un minuto para después lavar con agua destilada. Se agregó lugol durante un minuto, posteriormente se agregó alcohol al 95% y se lavó con agua destilada. Finalmente se adicionó safranina y se lavó con agua destilada estéril. Las muestras fueron observadas en el microscopio poniendo una gota de aceite de inmersión, las bacterias Gram positivas se observaron de color azul oscuro a morado, mientras que las Gram negativas tuvieron una coloración de color rosa a rojo.

6.8.2 Motilidad

Para esta prueba se utilizó un medio de cultivo semisólido (Cuadro 2):

Cuadro 2. Medio de cultivo semisólido	
Ingredientes	Cantidad
Extracto de carne	3 g
Peptona	10 g
Cloruro de sodio	5 g
Agar	4 g
Agua destilada	1000 ml

En tubos de ensaye se agregaron 20 ml del medio y se esterilizó, una vez sólido se inocularon tubos para cada una de las bacterias aisladas con ayuda de una aguja de inoculación. Se incubó el medio durante 24 horas a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ (Edwards y Ewing, 1986)

y se observó si se produjo un crecimiento turbio lejos de la línea de siembra (positivo) o bien, un crecimiento bacteriano acentuado siguiendo la línea de siembra (negativo).

6.8.3 Actividad proteasa

Se utilizó para esta prueba un medio de cultivo de gelatina nutritiva (Cuadro 3):

Ingredientes	Cantidad
Extracto de carne	3 g
Peptona	5 g
Gelatina	120 g
Agua destilada	1000 ml

El medio del cultivo se vació en tubos de ensaye con un tapón de gasa y se esterilizó, cada uno contenía 15 ml del medio, una vez que este solidificó se inocularon tubos para cada una de las cepas aisladas con ayuda de un asa bacteriológica hasta una profundidad de 1.5 a 2.5 cm. Los tubos fueron incubados a una temperatura de $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y se observó si hubo un crecimiento bacteriano y la digestión de la gelatina (licuefacción) cada 24 horas durante 2 semanas. Para el monitoreo de la licuefacción se colocaron los tubos en un baño de hielo durante un periodo de dos horas.

6.9.4 Actividad lecitinasa

Para esta prueba se utilizó agar nutritivo, al cual se le adicionó 25 ml de yema de huevo (Cuadro 4).

Ingredientes	Cantidad
Pluripeptona	5 g
Extracto de carne	3 g
Cloruro de sodio	8 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

El agar nutritivo se esterilizó y se dejó enfriar hasta que alcanzó una temperatura aproximada de 60°C, posteriormente, se adicionaron 25 ml de yema de huevo, la cual fue obtenida en condiciones asépticas lavando previamente el cascarón del huevo con hipoclorito de sodio al 5% y alcohol al 70%. El medio se vació en cajas petri de 100 x 15 mm de diámetro. Una vez solidificado, se inocularon cajas para cada una de las bacterias aisladas y se incubaron a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 96 horas. Las bacterias con actividad lecitinasa formaron una zona opaca a su alrededor (Baird-Parker, 1962).

6.9.5 Producción de antibióticos

La actividad antibiótica fue probada inoculando un matraz de 250 ml conteniendo 50 ml de caldo LB para cada uno de los aislados y se incubó durante 96 h, transcurrido este tiempo se obtuvo 1 ml del cultivo, se centrifugó a 13000 rpm y se recuperó el sobrenadante. Se sembró una placa de agar LB con *E. coli* ATCC con la técnica del césped, posteriormente se colocaron 10, 20, 30, 40 y 50 µl del sobrenadante sobre la caja, como control positivo se utilizaron 2 µg de ampicilina, la placa se incubó a una temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 48 horas.

6.10 Identificación molecular de las bacterias simbiotes de los NEPs *H. chongmingensis*, *O. myriophila* y *C. brenneri*

El ADN genómico total de las bacterias aisladas se obtuvo a partir de células incubadas en medio líquido LB durante 12 horas a 30°C, y se utilizó el kit de extracción Easy-DNA™

Después de obtener el ADN genómico se realizó la amplificación de la de la región 16S ARNr mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando los primers 63f (5´-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3´) y L1401 (5´-CGG TGT GTA CAA GAC CC-3´) (Nübel et al., 1996). Las condiciones de la PCR fueron 95°C durante 3 min desnaturalización inicial; 37 ciclos con 35 s de desnaturalización a 95°C; 42 s de hibridación a 59°C y extensión a 72°C durante 1 min 30s; se realizó una extensión final de 72°C durante 5 min.

Los productos del PCR fueron purificados por electroforesis en un gel de agarosa al 1%, los fragmentos de ADN fueron cortados del gel y mediante el kit de recuperación de ADN Zymoclean™. Una vez obtenido el ADN se mandó a secuenciar.

Las secuencias obtenidas fueron analizadas usando el programa informático BLAST para comparar las secuencias obtenidas con el bando de datos de NCBI.

7. RESULTADOS

7.1 Propagación de los NEPs

Los nemátodos de las tres especies fueron propagados en larvas de *G. mellonella* de 5° estadio, inoculando 200 µl por larva de la solución madre de nemátodos, aproximadamente a las 48 horas posteriores a la infección ya se observaban larvas muertas, se seleccionaron aquellas que presentaban una apariencia blanda y un cambio de coloración y fueron separadas, posteriormente fueron desinfectadas y se depositaron en una trampa White para incubarse durante 10 días a temperatura ambiente para la posterior colecta de nemátodos los cuales fueron recuperados y cuantificados.

7.2 Extracción de las bacterias simbiotes a los NEPs

Para la extracción de las bacterias simbiotes de las tres cepas de NEPs, se realizaron dos métodos de extracción: método de maceración y método de hemolinfa.

7.2.1 Método de maceración

Se cuantificaron un total de 60,000 JI y se repartieron en tres tubos Falcon® de 40 ml para los tres tratamientos identificados como trampa White, lavado con agua destilada estéril y tren de desinfección, para ser macerados por separado.

En el cuadro 5 se muestra el número de colonias obtenidas para los tres tratamientos de las tres especies estudiadas.

Cuadro 5. Número de colonias obtenidas a partir del método de maceración

Especie	Colonias obtenidas		
	Trampa White	Lavado con agua destilada estéril	Tren de desinfección
<i>H. chongmingensis</i>	3	-	-
<i>O. myriophila</i>	4	2	2
<i>C. brenneri</i>	3	3	1

Para *H. chongmingensis* se obtuvieron tres colonias en la muestra que fue obtenida de la trampa White, las placas sembradas con la alícuota obtenida del de los nemátodos con el lavado con agua destilada estéril y el tren de desinfección no mostraron crecimiento.

Para *O. myriophila* se obtuvieron cuatro colonias del macerado obtenido directamente de la trampa White, para la muestra del lavado con agua destilada estéril se obtuvieron dos colonias, y finalmente para el que la muestra que fue desinfectada se obtuvieron dos colonias.

Para *C. brenneri* se obtuvieron tres colonias del macerado obtenido directamente de la trampa White, para la muestra que se sometió a un lavado con agua destilada estéril de igual manera se obtuvieron tres colonias, y finalmente para la muestra que se pasó por el tren de desinfección se obtuvo una colonia.

Cabe señalar que, para todas las muestras estudiadas las colonias mencionadas para las tres especies crecieron las placas de agar LB y HCT.

7.3.2 Método de la hemolinfa

Se inocularon larvas de *G. mellonella* con 100 JI. Para este método se seleccionaron tres tiempos para la extracción 48, 72 y 96 horas; cabe señalar que las larvas murieron aproximadamente a las 72 horas. Para la extracción se eligieron larvas al azar para cada una de las especies.

Cuadro 6. Número de colonias obtenidas a partir del método de la hemolinfa

Especie	Colonias obtenidas		
	48 horas	72 horas	96 horas
<i>H. chongmingensis</i>	4	2	2
<i>O. myriophila</i>	2	1	1
<i>C. brenneri</i>	2	1	1

Para *H. chongmingensis* se obtuvieron 4 colonias en las larvas estudiadas a las 48 y 72 horas posteriores a la infección, mientras que para la larva estudiada a las 96 horas se obtuvieron 3.

Para *O. myriophila* se obtuvieron 2 colonias de la hemolinfa de las larvas estudiadas a las 48 y 72 horas, mientras que para la última muestra se obtuvo una sola colonia.

Para *C. brenneri* se obtuvieron 3 colonias para las tres muestras de hemolinfa obtenidas.

Las colonias mencionadas para las tres especies crecieron las placas de agar LB y HCT.

Debido a que se observaron colonias con diferentes características en los distintos métodos de extracción, se seleccionaron aquellas que estuvieron presentes en ambos casos. Por lo que para las tres especies se encontraron 2 colonias para cada especie (Fig. 6).

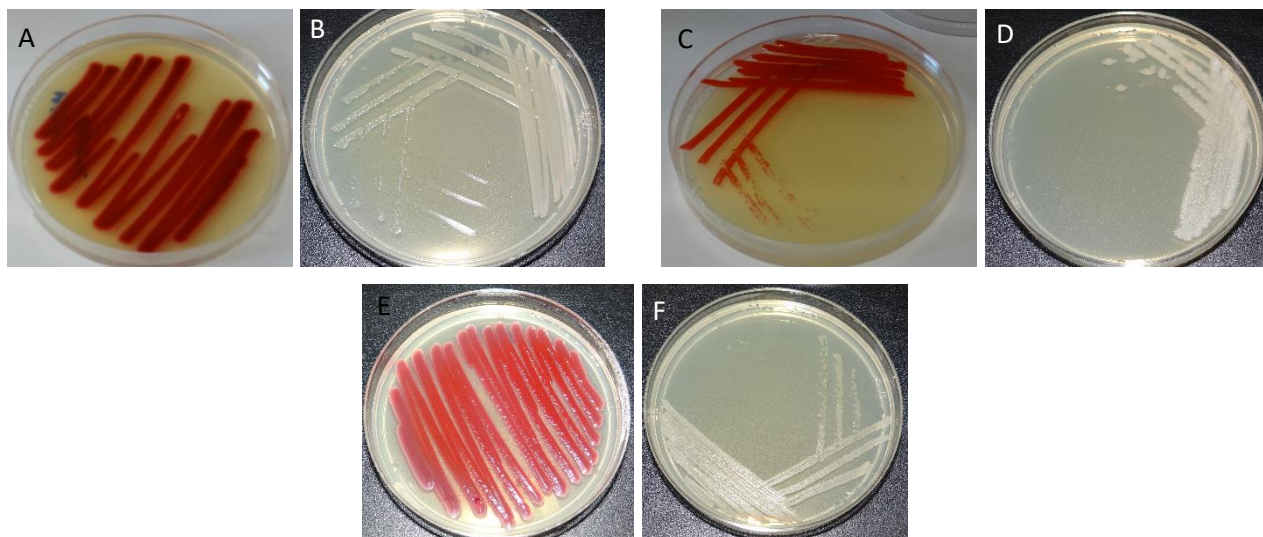


Figura 6. Colonias sembradas en placas de agar LB obtenidas de los aislamientos. A) MC2-R, B) MC2-B (aisladas de *H. chongmingensis*); C) MC5-R, D) MC5-B (aisladas de *O. myriophila*); E) DS-R y F) DS-B (aisladas de *C. brenneri*).

7.5 Bioensayos de patogenicidad y virulencia

Para determinar la patogenicidad de las bacterias aisladas se realizaron bioensayos utilizando 10 larvas de *G. mellonella* y *T. molitor* de 5° estadio por unidad experimental con tres repeticiones y tres réplicas.

Los métodos de inoculación fueron por inyección de la bacteria directamente en el hemocele de la larva y por medio de una herida, la cual se realizó pinchando a la larva con la ayuda de una aguja para insulina de 0.3 ml, posteriormente con la ayuda de una micropipeta se aplicaron los 10 μ l de la suspensión bacteriana. La concentración de bacteria utilizada durante los bioensayos de patogenicidad fue de 10^5 células/larva, y los porcentajes de mortalidad fueron tomados a las 24 y 48 horas. Como control positivo se utilizó una cepa entomopatógena de *S. marcescens*, y como controles negativos una cepa de *E. coli* ATCC y agua destilada estéril.

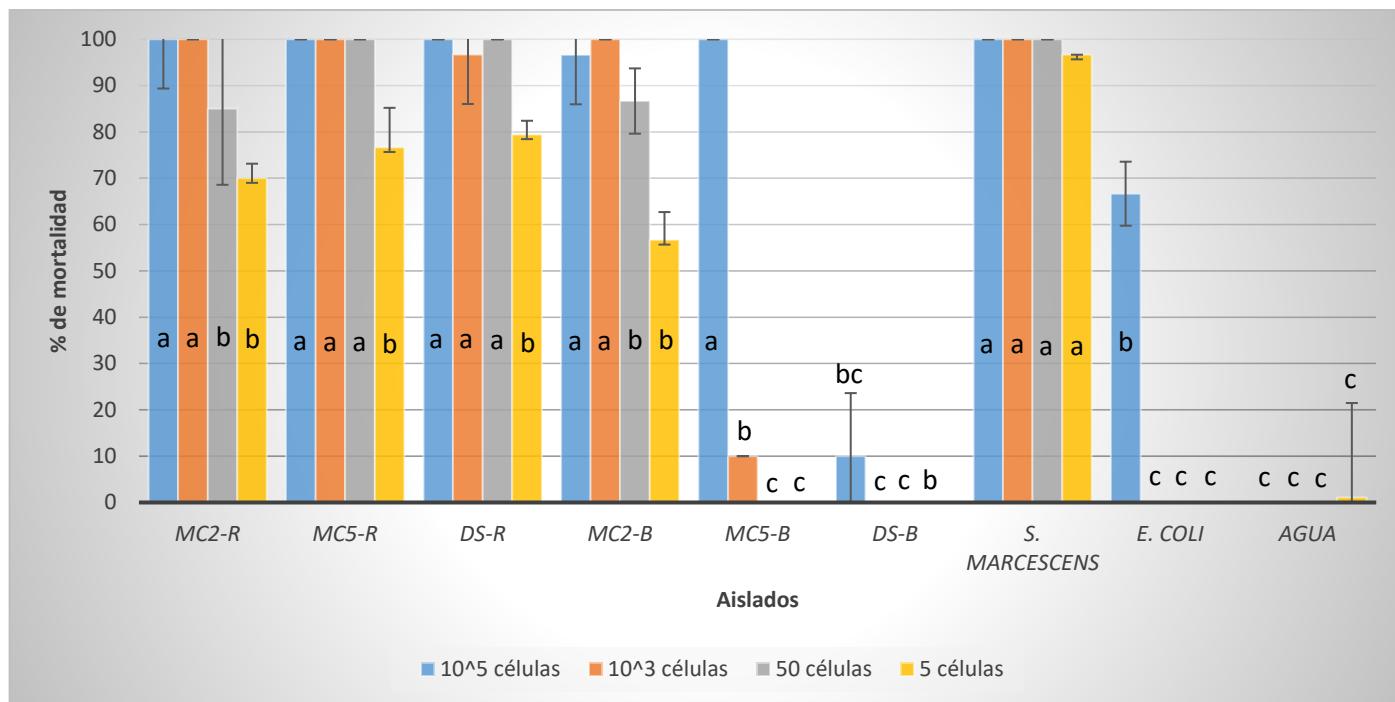


Figura 8. Porcentajes de mortalidad a las 48 horas de las cepas aisladas y los controles sobre larvas de *G. mellonella* con las diferentes concentraciones utilizadas. * Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

A partir de un inóculo de 10^5 células por larva (Fig. 8) se obtuvieron porcentajes de mortalidad de hasta el 100% a la 48 h para los aislados MC2-R, MC5-R, DS-R, MC5-B y el control positivo *S. marcescens*, para el aislado MC2-B fue del 96.6%, mientras que para DS-B fue del 10%. En el caso de los controles negativos *E. coli* y agua fue del 66.66% y 0% respectivamente.

Posterior a los bioensayos de patogenicidad se redujeron las concentraciones a utilizar para determinar la virulencia de cada uno de los aislados (Fig. 8), para una concentración de 10^3 células/ larva los porcentajes de mortalidad fueron del 100% para MC2-R, MC5-R, MC2-B y para el control *S. marcescens*, para DS-R y DS-B fue del 96.66% y del 0% respectivamente, en el caso del control negativo *E. coli* la mortalidad descendió hasta el 0%.

Para el caso de la concentración de 50 células/larva los porcentajes fueron del 100% para MC5-R, DS-R y *S. marcescens*, MC2-B y MC2-R presentó un 86.66% y 85%

respectivamente, y finalmente el aislado MC5-B, así como los controles negativos presentaron un 0% de mortalidad.

Al seguir obteniendo valores por encima del 50% se utilizó una última concentración de 5 células/larva, siendo la mortalidad del 96.66% para *S. marcescens*, para DS-R, MC5-R, MC2-R y MC2-B fueron del 79.44%, 76.66%, 70% y 56.66% respectivamente, en el caso del agua destilada estéril fue del 1.11%.

Cabe destacar que se realizó un análisis de varianza, el cual indica que existen diferencias significativas en los porcentajes de mortalidad de los diferentes aislados y los controles utilizados ($p < 0.05$).

Los resultados obtenidos revelan que los aislados MC2-R, MC5-R, DS-R, MC2-B y el control positivo *S. marcescens* presentan una $DL_{50} < 10$ células inyectadas en larvas de *G. mellonella* de 5° estadio.

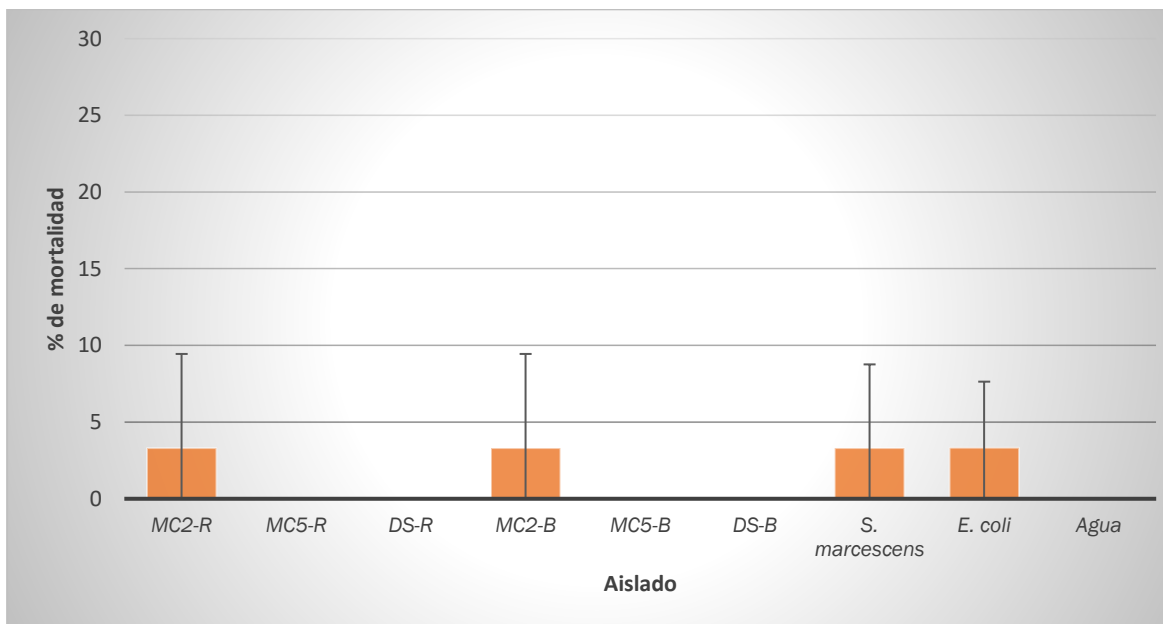


Figura 9. Porcentajes de mortalidad de las cepas aisladas y los controles sobre larvas de *G. mellonella* infectadas por herida con un inóculo de 1×10^5 células (Media \pm error estándar). No se encuentran diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p > 0.4029$).

La mortalidad de las larvas infectadas mediante una herida fue menor en comparación con el tratamiento anterior, para las cepas DS-R, MC5-R, DS-B, MC5-B y agua fue del 0%, para MC2-R, MC2-B, *S. marcescens* y *E. coli* fue de 3.33%, (Fig. 9). Se realizó un análisis de varianza de la mortalidad para cada una de las cepas estudiadas, encontrando que no existen diferencias significativas entre las mismas ($P>0.4029$).

Debido a que las mortalidades observadas en la inoculación por medio de herida fueron bajas, los siguientes bioensayos de patogenicidad fueron sólo inoculando por inyección.

A continuación, se muestran los signos de los cadáveres de larvas de *G. mellonella* infectados con los diferentes aislados obtenidos (Fig. 10).

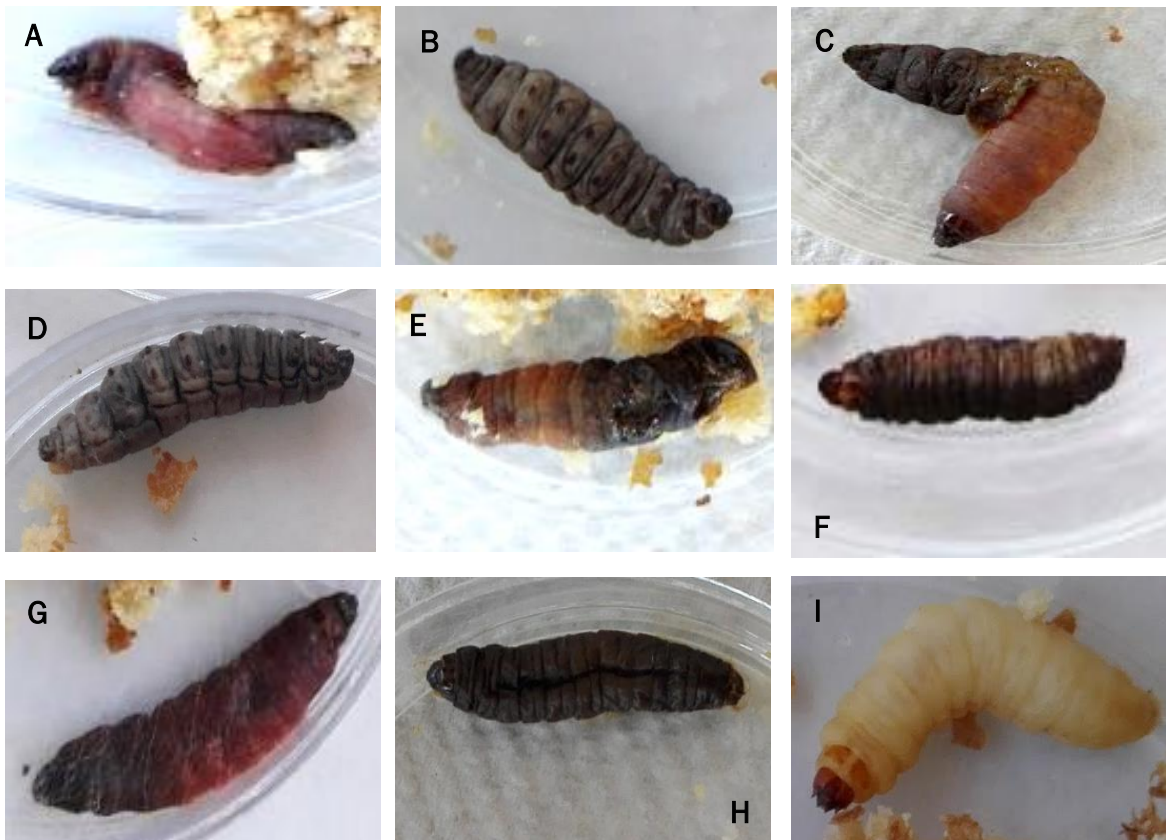


Figura 10. Cadáveres de *G. mellonella* infectados con los diferentes aislados obtenidos.
A) MC2-R, B) MC2-B, C) MC5-R, D) MC5-B, E) DS-R, F) DS-B, G) *S. marcescens*, H) *E. coli*,
I) larva sana.

Para el caso de los bioensayos con *T. molitor* se estudiaron a tres concentraciones de inoculación 10^5 , 10^4 y 10^3 células/larva (Fig. 11).

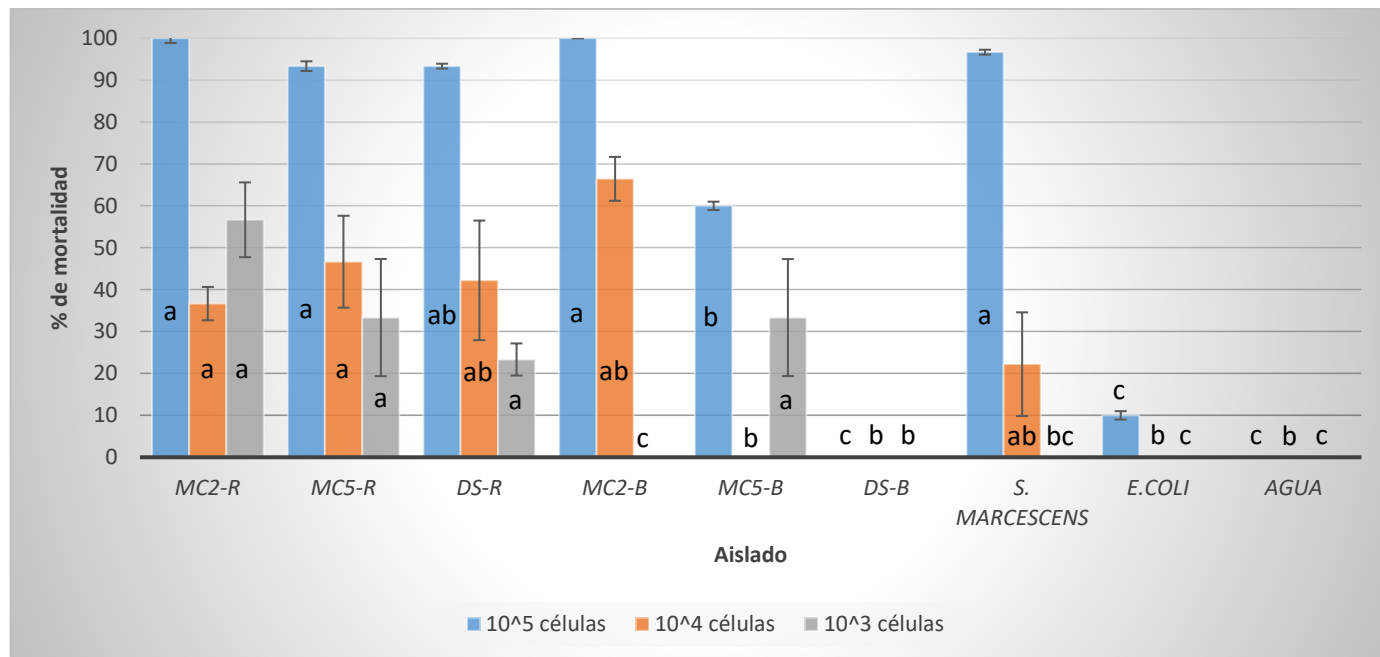


Figura 11. Porcentajes de mortalidad de las cepas aisladas y los controles sobre larvas de *T. molitor* con las diferentes concentraciones utilizadas (Media \pm error estándar). * Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Los porcentajes de mortalidad en el caso de larvas de *T. molitor* de 5° estadio a partir de una concentración de 10^5 células fueron del 100% para los aislados MC2-R y MC5-B, para el control positivo *S. marcescens* fue del 96.66%, en el caso de MC5-B y DS-R fue del 93.33%, MC5-B presentó un 60% de mortalidad y los controles negativos *E. coli* y agua destilada estéril un 10% y 0%.

La concentración de bacteria inyectada se redujo a 10^3 células/larva, y los porcentajes fueron del 56.66% para MC2-R, del 33.33% para MC5-R y MC5-B y 23.33% para DS-R, en el caso del resto de los aislados y los controles negativos fueron del 0%.

Finalmente, se utilizó una concentración intermedia a las dos anteriores, la cual fue de 10^4 células/larva mostrando porcentajes de 66.44%, 46.66%, 42.22%, 36.66% y

22.22% para MC2-B, MC5-R, DS-R, MC2-R y *S. marcescens* respectivamente, para MC5-B y DS-B fue del 0% al igual que para los controles negativos.

Se realizó un análisis de varianza de los bioensayos realizados con *T. molitor*, el cual indica que existen diferencias significativas en la mortalidad de los diferentes aislados, para las cuatro concentraciones utilizadas ($p < 0.05$).

Con los resultados obtenidos a partir de los porcentajes de mortalidad se llevó a cabo el cálculo de la DL_{50} utilizando el programa informático PoloPlus, los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 7.

Cuadro 7. DL_{50} de los aislados obtenidos.

Aislado	DL_{50}	Límites de confianza al 95%		Valor de chi cuadrada
		Inferior	Superior	
MC5-R	4694	635.92	18299	41.325
DS-R	7215.2	2404.1	20080	27.427
<i>S. marcescens</i> (control positivo)	17717	6324.7	58572	53.125

La DL_{50} se pudo obtener para dos de los aislados y *S. marcescens* los cuales fueron 4694, 7215.2 y 17717 células/larva de *T. molitor*, respectivamente. Para el resto de los cuatro aislados es necesario realizar bioensayos con una dosis intermedia a 10^4 y 10^3 células/larva para poder obtener su DL_{50} la cual podría ser de 5000 células/larva.

En la figura 12 se muestran los signos de los cadáveres de las larvas de *T. molitor* infectados con los diferentes aislados.

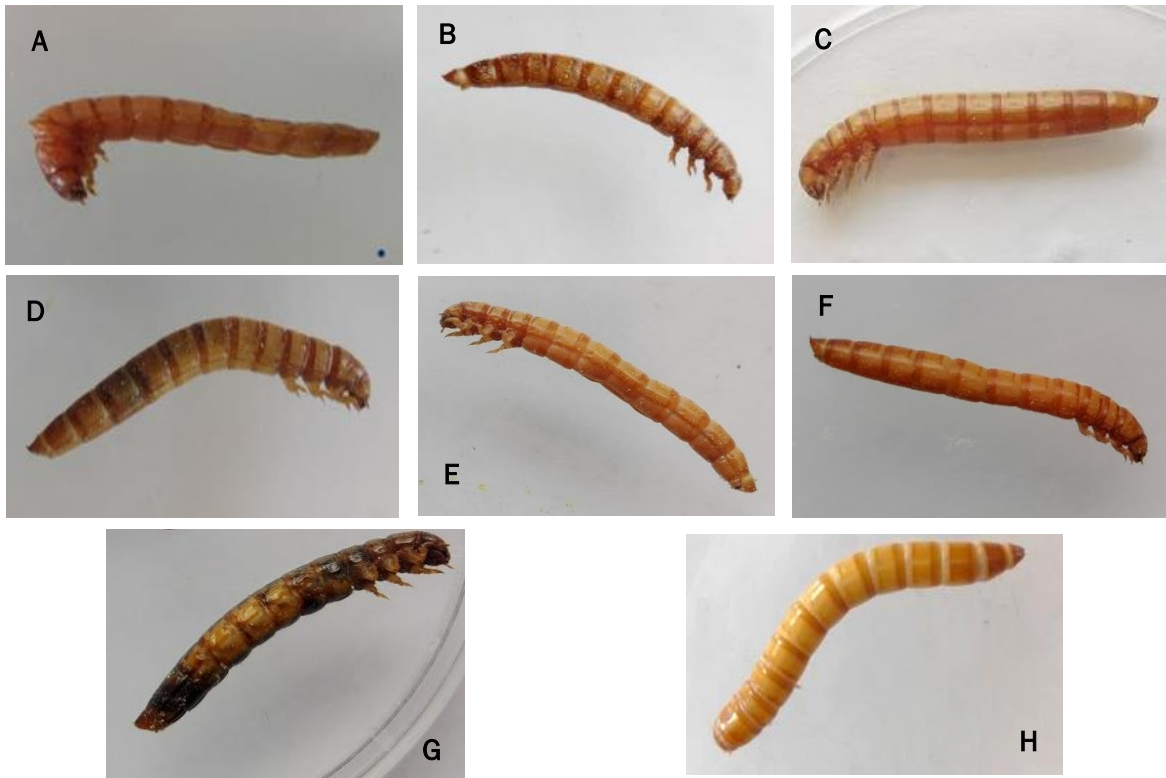


Figura 12. Cadáveres de *T.molitor* infectados con los diferentes aislados obtenidos. A) MC2-R, B) MC2-B, C) MC5-R, D) MC5-B, E) DS-R, F) *S. marcescens*, G) *E. coli*, H) larva sana.

7.6 Identificación bioquímica de los las baterías simbiotes de los NEPs *H. chongmingensis*, *O. myriophila* y *C. brenneri*.

7.6.1 Tinción de Gram

Se llevó a cabo la tinción de Gram de los diferentes aislados obtenidos, donde aquellos que presentaron una coloración roja a rosa son Gram negativos, mientras que los de coloración morada/violeta son Gram positivos (Fig. 13).

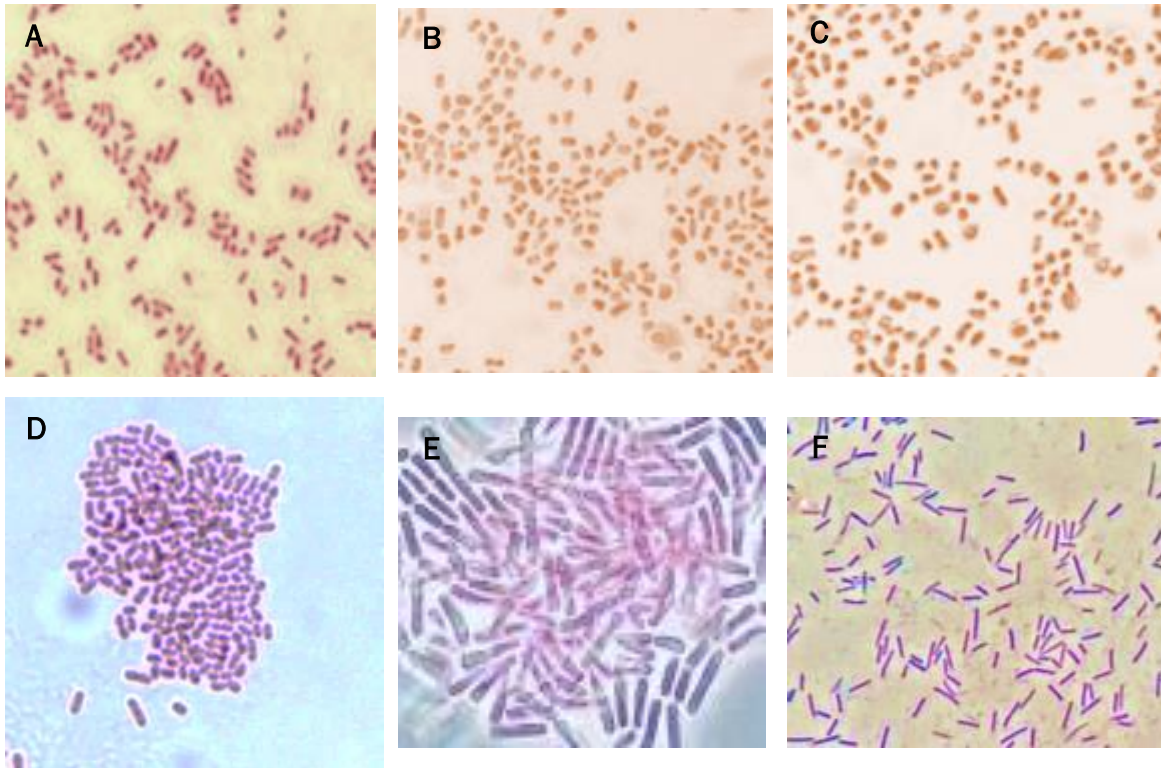


Figura 13. Tinción de Gram de los diferentes aislados. Siendo Gram negativos A) MC2-R, B) MC5-R y C) DS-R, mientras que D)MC2-B, E) MC5-B, y F) DS-B fueron Gram positivas.

7.6.2 Motilidad

Las pruebas de motilidad se llevaron a cabo utilizando un medio de cultivo semisólido contenido en tubos de ensayo, los cuales fueron inoculados con los aislados para ser incubados a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 h.

Los resultados fueron positivos para los aislados MC2-R, MC2-B, MC5-R y DS-R ya que presentaban un halo de crecimiento alrededor del área de inoculación, para el resto fueron negativas ya que no se observó dicho halo, como control positivo se utilizó una cepa de *S. marcescens* y como control negativo una cepa de *Klebsiella pneumoniae* (fig. 14).

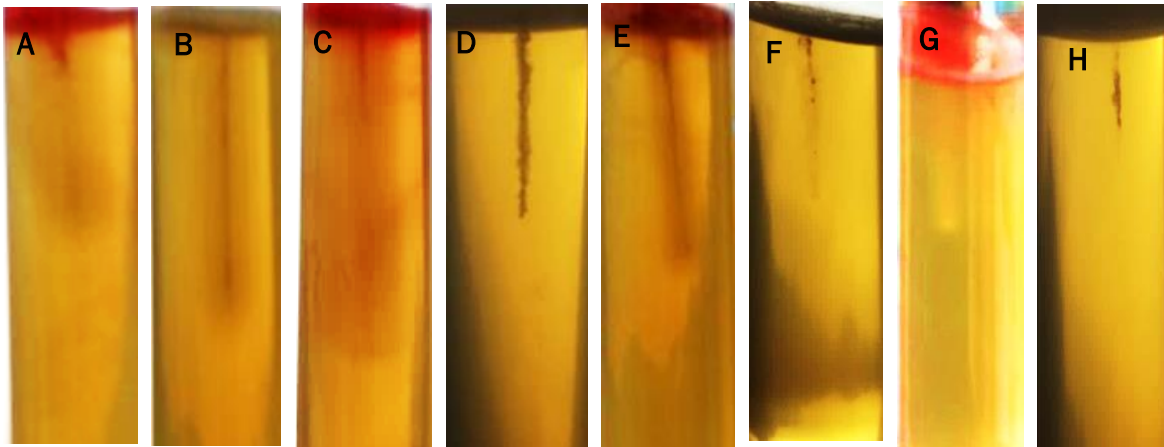


Figura 14. Resultados de las pruebas de motilidad, donde en los resultados positivos se observa un halo alrededor del sitio de inoculación. A) MC2-R, B) MC2-B, C) MC5-R, E) DS-R, F) DS-B (Positivos), D) MC5-B tuvo un resultado negativo, G) *S. marcescens* control positivo y H) *K. pneumoniae* control negativo.

7.6.3 Actividad proteasa

Estas pruebas fueron realizadas con el medio de cultivo gelatina nutritiva contenida en tubos de ensayo, se utilizaron controles positivos y negativos, los cuales fueron las cepas utilizadas con anterioridad de *S. marcescens* y *E. coli* esta última no presenta actividad proteasa. Dichos tubos fueron inoculados con los diferentes aislados y controles e incubados por 2 semanas para finalmente colocarlos en hielo y ver la licuefacción. Todos los aislados tuvieron actividad proteasa, mientras que el medio donde se sembró la cepa de *E. coli* no mostró licuefacción, es decir no presenta dicha actividad (Fig. 15).

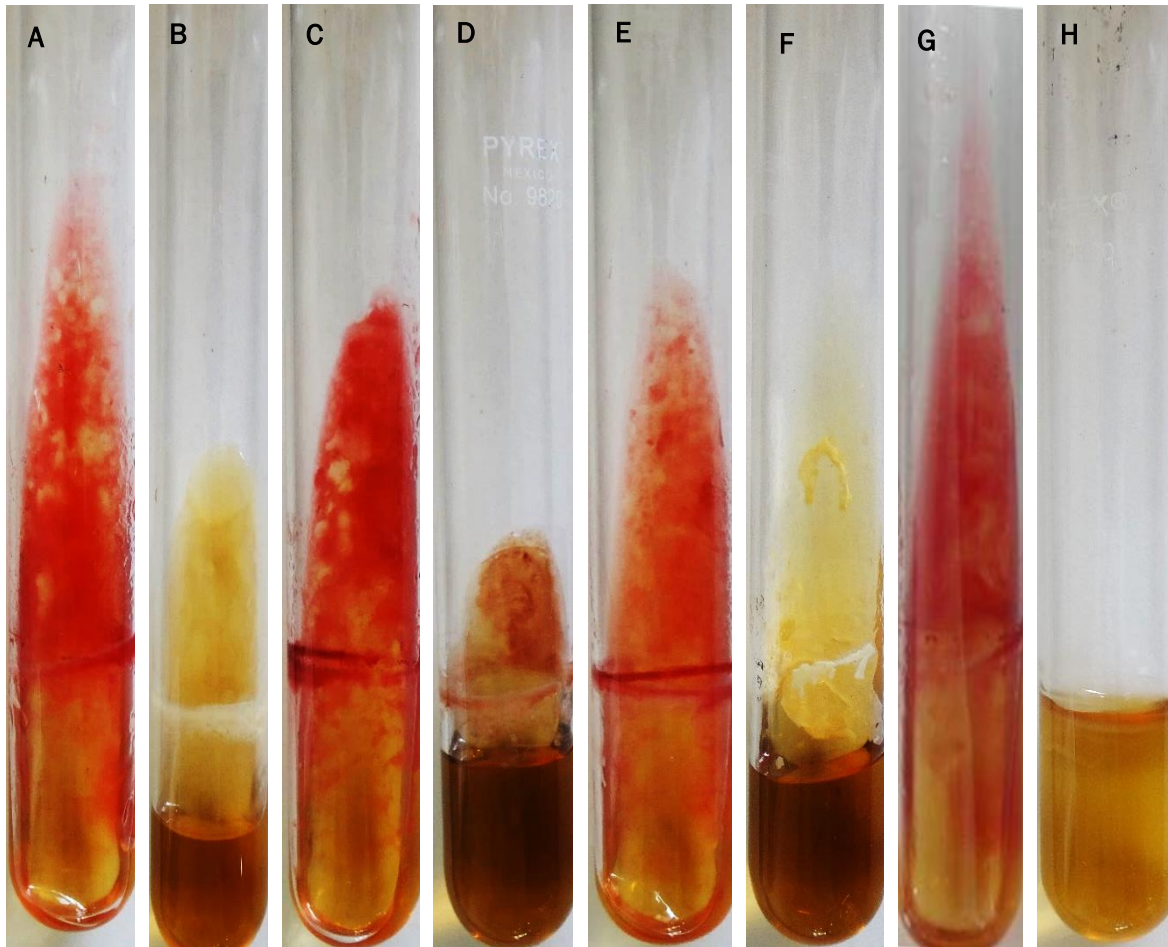


Figura 15. Resultados de actividad proteasa. A) MC2-R, B) MC2-B, C) MC5-R, D) MC5-B, E) DS-R y F) DS-B son positivos ya que observa la licuefacción del medio gelatina nutritiva. G) Control positivo *S. marcescens* y H) Control negativo *E. coli*.

7.6.4 Actividad lecitinasa

La actividad lecitinasa se observó a partir de agar nutritivo adicionado con yema de huevo estéril y aquellos aislados que mostraban un halo blanco alrededor del crecimiento bacteriano fueron considerados como positivos. La aparición de dicho halo se monitoreo a las 48 y 96 h. En la figura 16 se puede observar que los aislados MC2-R, MC5-R, DS-R, MC2-B y DS-B y el control positivo *S. marcescens* presentan la actividad lecitinasa, mientras que MC5-B y *E. coli* como el control negativo no mostraron dicha actividad.

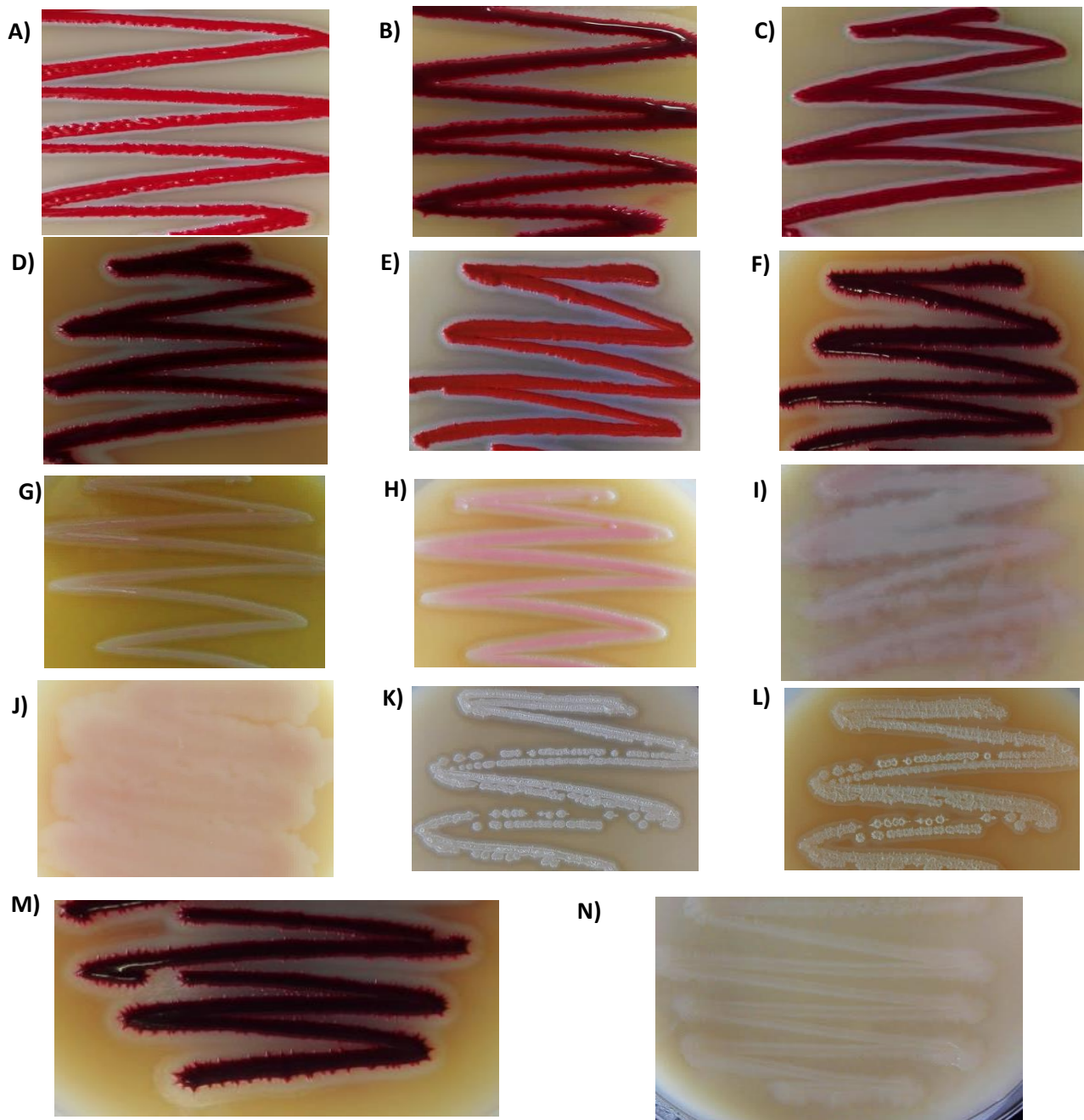


Figura 16. Resultados de actividad lecitinasa. A) MC2-R, C) MC5-R, E) DS-R, G) MC2-B y K) DS-B a las 48 h; B) MC2-R, D) MC5-R, F) DS-R, H) MC2-B y L) DS-B a las 96 h, dichos aislados muestran actividad lecitinasa. MC5-B a las I) 48 h, J) 96 h no presenta actividad lecitinasa. M) *S. marcescens* control positivo y N) *E. coli* control negativo a las 96 horas.

7.6.5 Producción de antibióticos

Para la estudiar la producción de antibióticos se llevaron a cabo cultivos de los diferentes aislados en medio LB líquido incubado durante 12 h, la actividad antibiótica fue medida contra una cepa de *E. coli* ATCC, sin embargo, no se observaron halos de inhibición para ninguno de los aislados.

7.7 Identificación molecular de las bacterias simbiotes de los NEPs *H. chongmingensis*, *O. myriophila* y *C. brenneri*

Se llevó a cabo la extracción de ADN utilizando el Kit de extracción Easy-DNA™ para posteriormente realizar la PCR. Al correr los productos obtenidos de la PCR en el gel de agarosa al 1%, se observaron fragmentos con un peso aproximado de 1350 pb (figura 17).

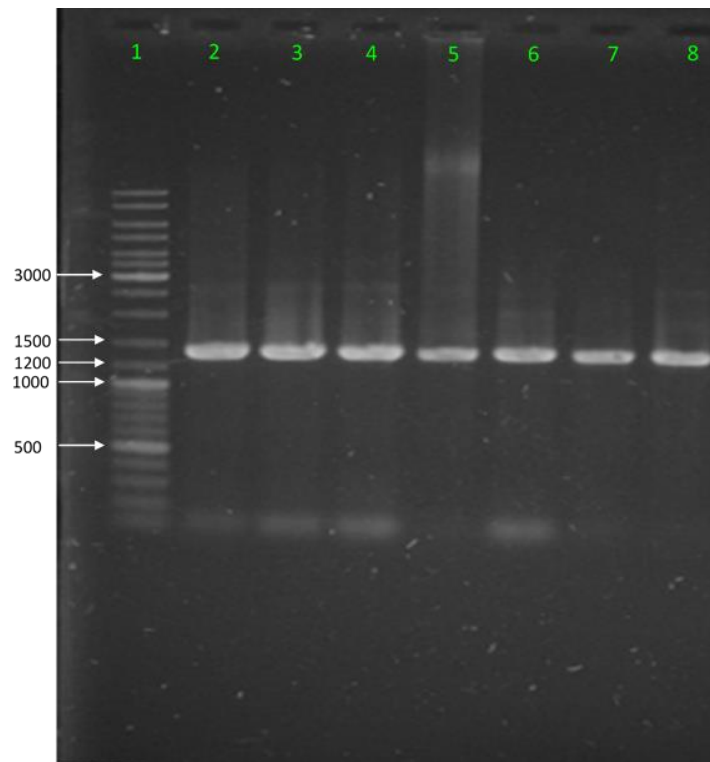


Figura 17. Gel de agarosa al 1% donde se observan los productos de la PCR. Los fragmentos amplificados tienen un tamaño aproximado de 1350 pb. 1) Marcador de peso molecular, 2) MC2-R, 3) MC5-R, 4) DS-R, 5) MC2-B, 6) MC5-B, 7) DS-B y 8) *S. marcescens*.

Se utilizó el Kit Zymoclean™ para la recuperación de ADN de gel de agarosa, una vez obtenido se mandó a secuenciar el producto al Instituto de Biotecnología de la UNAM (Universidad Nacional Autónoma de México). Las secuencias obtenidas (Anexo 1) fueron analizadas en la plataforma BLAST del NCBI, obteniendo los resultados mostrados en la figura 18.

A)	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Serratia marcescens strain NBRC 102204 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1504	1504	99%	0.0	99%	NR_114043.1
<input type="checkbox"/>	Serratia nematodiphila strain DZ0503SBS1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1498	1498	99%	0.0	99%	NR_044385.1
<input type="checkbox"/>	Serratia marcescens strain JCM 1239 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1496	1496	99%	0.0	99%	NR_113236.1
<input type="checkbox"/>	Serratia marcescens subsp. sakuensis strain KRED 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1493	1493	99%	0.0	99%	NR_036886.1
<input type="checkbox"/>	Serratia marcescens strain DSM 30121 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1493	1493	99%	0.0	99%	NR_041980.1

B)	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Serratia nematodiphila strain DZ0503SBS1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1629	1629	99%	0.0	98%	NR_044385.1
<input type="checkbox"/>	Serratia marcescens strain NBRC 102204 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1624	1624	99%	0.0	98%	NR_114043.1
<input type="checkbox"/>	Serratia marcescens subsp. sakuensis strain KRED 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1624	1624	99%	0.0	98%	NR_036886.1

C)	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Bacillus mobilis strain MCCC 1A05942 16S ribosomal RNA, partial sequence	1400	1400	100%	0.0	98%	NR_157731.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus thuringiensis strain NBRC 101235 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1397	1397	100%	0.0	98%	NR_112780.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus proteolyticus strain MCCC 1A00365 16S ribosomal RNA, partial sequence	1395	1395	100%	0.0	98%	NR_157735.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus wiedmannii strain FSL W8-0169 16S ribosomal RNA, partial sequence	1395	1395	100%	0.0	98%	NR_152692.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus toyonensis strain BCT-7112 16S ribosomal RNA, partial sequence	1395	1395	100%	0.0	98%	NR_121761.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus thuringiensis strain ATCC 10792 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1395	1395	100%	0.0	98%	NR_114591.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus thuringiensis strain IAM 12077 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1395	1395	100%	0.0	98%	NR_043403.1

D)	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Bacillus zhangzhouensis strain MCCC 1A08372 16S ribosomal RNA, partial sequence	952	952	100%	0.0	98%	NR_148786.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus safensis strain NBRC 100820 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	952	952	100%	0.0	98%	NR_113945.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus pumilus strain NBRC 12092 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	952	952	100%	0.0	98%	NR_112637.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus safensis strain FO-36b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	952	952	100%	0.0	98%	NR_041794.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus pumilus strain ATCC 7061 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	952	952	100%	0.0	98%	NR_043242.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus pumilus strain CIP 52.67 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	952	952	100%	0.0	98%	NR_115334.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus australimaris strain MCCC 1A05787 16S ribosomal RNA, partial sequence	946	946	100%	0.0	98%	NR_148787.1

Figura 18. Resultados obtenidos del BLAST. A) MC5-R, B) DS-R, C) MC2-B D) DS-B.

De acuerdo con los resultados obtenidos a partir del BLAST, los aislados MC5-R y DS-R pertenecen al género *Serratia*, mientras que MC2-B y DS-B al género *Bacillus*.

8. DISCUSIÓN

Los NEPs son considerados como una alternativa para el control biológico de insectos, debido a su capacidad para infectar y matar insectos, esto debido a la asociación simbiótica con bacterias, las cuales se encuentran en el interior del

nemátodo, esta asociación mata al hospedero a las pocas horas después de infectarlo (24 a 48h) (Kaya y Gaugler, 1993; Dilman *et al.*, 2012, Lewis y Clarke, 2012), y ambos organismos se ven beneficiados (Poinar y Thomas, 1966; Poinar *et al.*, 1977; Grewal *et al.*, 1997; Han y Ehlers, 1998).

Las bacterias asociadas a los NEPs producen diferentes metabolitos secundarios, esto con la finalidad de matar al insecto hospedero, entre ellas se encuentran proteínas tóxicas, así como antimicrobianos ya que tienen que vencer microorganismos que son competidores de nutrientes. Se ha demostrado que las bacterias presentes en el intestino de los insectos aparecen en la hemolinfa poco después de la invasión de los nemátodos, posteriormente estos competidores fueron eliminados cuando *X. nematophila* se convirtió en la especie dominante (Gouge y Snyder, 2006). Para competir por los recursos de nutrientes del insecto *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* producen bacteriocinas, proteínas tipo E3 killer, complejos de toxinas y varios metabolitos secundarios (Thaler *et al.*, 1995; Singh y Banerjee; French-Constant y Waterfiel, 2006).

Para la producción de los NEPs y su uso en el control biológico se lleva a cabo la producción *in vitro* (medios sólidos y líquidos) (Susurluk *et al.* 2013). El cual se basa en la inoculación de la bacteria simbiote a un medio nutritivo, para posteriormente introducir los nemátodos desinfectados (Akhurst, 1980). Por lo que es necesario tener a la bacteria simbiote de los NEPs de interés, ya que si se busca su producción a gran escala la bacteria debe estar identificada y caracterizada.

En el presente trabajo se aislaron las bacterias simbiotes de tres especies de NEPs aislados previamente en el estado de Morelos, cabe resaltar que estas especies no habían sido reportadas aisladas en el continente americano.

Se realizaron dos métodos de extracción, lo cual nos permitió encontrar 2 colonias para cada una de las especies *H. chongmingensis*, *O. myriophila* y *C. brenneri*; en diversos trabajos se ha reportado el aislamiento de un consorcio de bacterias asociadas a una especie de nemátodo, tales como *O. carolinensis* (Nematoda: Rhabditidae) el cual está asociado a cuatro especies de bacterias, las cuales son *S. marcescens*, *Enterococcus mundtii*, *Achromobacter xylosoxidans* y *Providencia rettgeri*.

En este estudio se utilizaron tres métodos de extracción (Torres-Barragán *et al.*, 2011). Otro caso es el nemátodo *Rhabditis (Oscheius)* spp. aislado de diferentes zonas agroclimáticas en Kerala, India, del cual se obtuvieron 18 aislados del JI cuya superficie fue desinfectada previamente, estos se subdividieron en nueve géneros filogenéticamente diferentes basados en el análisis de la secuencia comparativa de sus genes 16s ARNr. Los aislamientos estaban afiliados a tres diferentes clases, γ -*proteobacteria* (*Enterobacter*, *Proteus*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*), β -*proteobacteria* (*Alcaligenes*) y *Bacilli* (*Bacillus*, *Enterococcus*, *Lysinibacillus*) (Balakrishnan *et al.* 2016).

Para cada una de las especies de NEPs estudiadas se obtuvo una colonia de coloración roja al crecerlas en placas de agar LB, y otra de coloración blanca, después de llevarse a cabo la identificación bioquímica y molecular, se supo que dichas bacterias pertenecen al género *Serratia* en el caso de las colonias rojas, mientras que las otras pertenecen al género *Bacillus*. De acuerdo con la clasificación taxonómica las tres especies de nemátodos pertenecen a la familia *Rhabditidae*, y algunos nemátodos miembros de esa familia tienen una relación mutualista con el género *Serratia*, entre ellos están *O. carolinensis* (asociado a *S. marcescens*) para el cual se cree que la bacteria está presente en la cutícula del nemátodo (Balakrishnan *et al.* 2016); *C. briggsae* la cual está en asociación con *Serratia* sp. SCBI y está ubicada en el intestino del nemátodo (Abebe *et al.*, 2010). En cuanto al género *Bacillus*, se han reportado aislamientos en algunas especies del género *Rhabditis* (Balakrishnan *et al.* 2016 y Kumar *et al.* 2014a).

Se evaluaron 2 métodos de inoculación de las bacterias aisladas, el primero fue inyectando la suspensión de bacterias directamente a la hemolinfa de larvas de *G. mellonella* de 5° estadio, para el segundo se hizo una punción a un costado de la larva con la ayuda de una aguja para insulina, y posteriormente se aplicó por contacto la suspensión de bacterias.

La mortalidad observada fue mayor en el caso de aquellas infectadas por inyección con hasta el 100%, mientras que los valores más altos de mortalidad en la infección por herida fue de 3.3%, en ambos casos la concentración del inóculo fue de 1×10^5 células. Se realizó otro bioensayo donde la concentración de bacterias inyectadas

se disminuyó a 1×10^3 células con la finalidad de determinar las concentraciones a utilizar en los bioensayos de virulencia, sin embargo, se siguieron observando mortalidades de hasta el 100% en algunos casos sobre larvas de *G. mellonella*. De acuerdo con los porcentajes de mortalidad obtenidos, se considera que la DL_{50} para los aislados MC2-R, MC5-R, DS-R, MC2-B es menor a 10 células/larva. Estos resultados coinciden con lo reportado por Forst en 1996, donde se menciona que algunas de las bacterias asociadas a los NEPs presentan una $DL_{50} < 10$ células cuando es inyectada directamente en el hemocele de la larva, considerando a la bacteria como entomopatógena de acuerdo con Bucher (1960), ya que para que sea considerada como tal, es necesaria una $DL_{50} < 10\ 000$ células.

Los porcentajes de mortalidad tan altos en el método de inoculación por inyección coinciden con Campos y colaboradores en el 2009, quienes llevaron a cabo evaluaciones de patogenicidad de la bacteria simbiote *Xenorhabdus* de un NEP aislado de La Rioja, España. En dicho estudio se utilizaron larvas de *Spodoptera littoralis*, las cuales se inyectaron con una concentración de 10^4 células en un volumen de 20 μ l, la mortalidad de las larvas fue observada hasta las 48 h después de la infección, donde se reportan porcentajes de mortalidad de hasta el 100%. De igual manera, Salvadori y colaboradores en el 2012 realizaron pruebas de patogenicidad sobre larvas de *S. frugiperda* de las bacterias simbiotes de varias especies de NEPs de la colección del Laboratorio de Patología de Insectos de Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, Brasil. Se les inyectó una concentración de 10^4 células, encontrando hasta un 90% de mortalidad después de tres días.

En cuanto a la mortalidad utilizando el método de inoculación por herida, los resultados difieren con lo reportado para el nemátodo *O. carolinensis* ya que al menos un aislado bacteriano presentó un porcentaje de mortalidad alto, se realizaron pruebas patogenicidad sobre larvas de 4º estadio de *Helicoverpa zea* donde los métodos de inoculación fueron por contacto y provocando heridas para después aplicar por contacto las bacterias, la concentración utilizada fue de 600 Unidades Formadoras de Colonia (UFC) y los porcentajes de mortalidad fueron del 100% para *S. marcescens* y de 0% para *A. xylosoxidans* en ambos tratamientos, para *E. mundtii* del 0% y 33.3% y para *P. rettgeri* del 0% y 25% en los tratamientos por contacto y herida respectivamente.

Para el caso de los bioensayos donde se inocularon larvas de *T. molitor* se alcanzaron porcentajes de hasta el 100% de mortalidad con un inóculo de 10^5 células, mientras que para el inóculo de 10^3 células, el mayor fue de 56.66%, los porcentajes de mortalidad en *T. molitor* son menores que en *G. mellonella*, estos resultados son parecidos a trabajos donde se han utilizado estos dos insectos como modelo de estudio, tanto para NEPs como para bacterias aisladas de los mismos, donde es posible observar una mayor susceptibilidad a organismos enteropatógenos en *G. mellonella* (Susurluk, 2006; Blackburn et al., 2016).

De igual manera, los resultados obtenidos a partir de los porcentajes de mortalidad revelan que los aislados MC5-R y DS-R son entomopatógenos al presentar una DL_{50} de 4694 y 7215.2 células/larva.

Cabe destacar que, al hacer los bioensayos, los cadáveres de las larvas que fueron inoculadas con las colonias de coloración roja presentaban signos similares a las inoculadas con el control positivo *S. marcescens*, es decir presentaban una coloración roja en la cutícula, además de flacidez, por lo que esta característica hizo suponer que al menos un aislado de cada especie de NEP pertenece al género *Serratia*, esto aunado a los reportes de las bacterias asociadas a nemátodos de la familia Rhabditidae.

Se llevaron a cabo pruebas para saber si las bacterias aisladas presentan actividad proteasa y lecitinasa, así como motilidad, encontrando que en la primera de ellas todas dieron un resultado positivo, mientras que para la actividad proteasa el aislado identificado como MC5-B no muestra dicha actividad, para la prueba de motilidad solo MC2-R, MC2-B, MC5-R y DS-R mostraron resultados positivos. Estas pruebas se llevaron a cabo, ya que se ha reportado que las bacterias simbiotes de NEPs *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* producen diferentes enzimas hidrolíticas, entre las que se encuentran proteasas, lipasas y quitinasas, las cuales matan al insecto y convierten los tejidos del hospedero en alimento para la replicación de la bacteria y la reproducción del nemátodo (Ffrench-Constant, et al., 2003), de igual manera dichas bacterias presentan flagelos (Staunton y Weissman, 2001; Van Lanen y Shen, 2008). Los resultados positivos coinciden con Guerra y colaboradores (2014) donde evaluó la patogenicidad de *Xenorhabdus* spp. nativos de Colombia, en dicho estudio se llevaron a cabo la caracterización bioquímica mediante pruebas de motilidad, actividad proteasa,

lipasa, lecitinasa, producción de antibióticos y la detección de luminiscencia, encontrando resultados positivos para todas las pruebas a excepción de la presencia de luminiscencia, ya que ésta es una característica de *Photorhabdus* (Forts y Nelson, 1996).

Estos resultados nos permiten observar que si bien algunos de los aislados no mostraron resultados positivos a todas las pruebas bioquímicas, éstas pueden actuar de manera conjunta ya que una vez que se encuentran en la hemolinfa del insecto y entran en la fase estacionaria las enzimas degradativas rompen las macromoléculas del cadáver del insecto, lo cual proporciona un suministro de nutrientes a los nemátodos en desarrollo, además de que se producen diferentes antibióticos de amplio espectro, lo cual impide la contaminación del cadáver por otros microorganismos (Akhurst, 1982; Akhurst y Boemare, 1990; Boemare y Akhurst, 1988; Neelson *et al.*, 1990). Los resultados obtenidos en el trabajo en cuanto a la producción de antibióticos difieren a otros reportes como los llevados a cabo por Kumar y colaboradores (2014 a y b) donde se aislaron dos bacterias de un NEP de la familia *Rhabditidae* y éstas mostraron actividad antibacteriana contra varias especies de bacterias entre ellas *V. cholerae* y *S. typhi*; esta falta de actividad en las bacterias aisladas durante el trabajo podría deberse a que, de ser necesario que la bacteria llegue a la fase estacionaria, y debido a que no conocemos la cinética de crecimiento no esperamos el tiempo suficiente para que la bacteria produzca estos metabolitos secundarios, por lo que se propone llevar a cabo una cinética de crecimiento para los aislados y llevar a cabo nuevas pruebas, o bien llevarlas a cabo con otras especies bacterianas.

De acuerdo a lo reportado las bacterias mutualistas *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* de los NEPs éstas pertenecen a la familia Enterobacteriaceae las cuales son Gram negativas, de igual manera el género *Serratia* pertenece a esta familia de bacterias (Ehlers, 1990; Boemare, 1993; Boemare, 1996, Abebe *et al.*, 2010, Torres-Barragán *et al.*, 2011), por lo que presentan la misma característica; otros trabajos han aislado bacterias de NEPs que no pertenecen a los géneros antes mencionados, sin embargo también son Gram negativas, tal es el caso de los 18 aislados obtenidos del nemátodo *Rhabditis (Oscheius)* spp. (Balakrishnan *et al.* 2016) los cuales están

afiliados a tres diferentes clases γ -proteobacteria, β -proteobacteria y Bacilli (Balakrishnan et al. 2016).

Las tinciones de Gram realizadas en el trabajo revelaron que el aislado MC2-B, MC5-B y DS-B son bacilos Gram positivos, por lo que a pesar de que la mayoría de las especies bacterianas asociadas con nemátodos entomopatógenos son Gram negativas, existen reportes donde se han aislado bacterias Gram positivas en NEPs del género *Rhabditis*, por ejemplo, en el nemátodo *O. carolinensis*, el cual está asociado a *E. mundtii* (Torres-Barragán y colaboradores en el 2012), otro reporte pertenece a Kumar y colaboradores (2014a) donde se aisló a la especie *B. cereus* siendo ésta Gram positiva.

9. CONCLUSIONES

Se obtuvieron dos aislados para cada una de las tres especies de NEPs estudiadas, éstas fueron encontradas a partir de dos métodos de extracción, dichos aislados fueron etiquetados de la siguiente manera, MC2-R y MC2-B para *H. chongmingensis*, en el caso de *O. myriophila* como MC5-R y MC5-B y finalmente DS-R y DS-B para *C. brenneri*.

La DL₅₀ para los aislados MC2-R, MC5-R, DS-R y MC2-B fue <10 células inyectadas directamente en el hemocele de larvas de *G. mellonella* de 5º estadio, por lo que son consideradas como entomopatógenas. Respecto al método de inoculación mediante herida con 10⁵ células los porcentajes de mortalidad para los aislados fueron: 3.3% en MC2-R, MC2-B, *S. marcescens* y *E. coli* fue de y 0% en MC5-R, MC5-B, DS-R y DS-B.

Para el caso de *T. molitor* los aislados MC5-R y DS-R presentan una DL₅₀ de 4694 y 7215.2 células/larva, para el resto de los aislados no fue posible calcularla.

La caracterización bioquímica reveló lo siguiente:

- ✓ Los aislados MC2-R, MC2-B y MC5-R son Gram negativos, mientras que MC5-B, DS-R y DS-B son Gram positivos.
- ✓ MC2-R, MC2-B, MC5-R, MC5-B, DS-R, DS-B presentan motilidad, MC5-B no presenta dicha actividad.
- ✓ Todos los aislados presentan actividad proteasa.
- ✓ MC2-R, MC2-B, MC5-R, MC5-B, DS-R, DS-B presentan actividad lecitinasa, MC5-B no presenta dicha actividad.
- ✓ Ninguno de los aislados presenta actividad antibiótica.

De acuerdo con la identificación molecular los aislados MC5-R y DS-R son del género *Serratia*, mientras que MC2-B y DS-B al género *Bacillus*.

10. BIBLIOGRAFÍA

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

Abebe, E., Jumba, M., Bonner, K., Gray, V., Morris, K., et al. 2010. An entomopathogenic *Caenorhabditis briggsae*. *Journal of Experimental Biology*. 213:3223–3229.

Adams, B. J. y Nguyen, K. B. 2002. Taxonomy and Systematics. En: Entomopathogenic nematology. CAB International. (Ed.) R. Gaugler. p. 311-326.

Agro-Bio. 2014. BIOTECNOLOGÍA & ALIMENTACIÓN. La biotecnología agrícola, una aliada en el control de plagas de los cultivos. En línea: <http://agrobio.org/bfiles/des_archivo-297.pdf> [consulta: 15 de diciembre 2016].

Akhurst, R. J. 1980. Morphological and functional dimorphisms in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoplectana* and *Heterorhabditis*. *Journal of General Microbiology*. 121: 303–309.

Akhurst, R. J. 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.

Akhurst, R. J. y Boemare, N. E. 1988. A numerical taxonomic study of the genus *Xenorhabdus* (Enterobacteriaceae) and proposed elevation of the subspecies of *X. nematophilus* to species. *Journal of General Microbiology*, 134: 1835-1845.

Akhurst, R.J. y Boemare, N. E. 1990. Biology and taxonomy of *Xenorhabdus*. En: R. Gaugler y H. K. Kaya. (Ed.) Entomopathogenic nematodes in Biological Control. CRC Press, Boca Raton, FL. 79–90.

Arias, Y. M. B. y Murillo, P. M. A. 2013. Evaluación de dos métodos de extracción de la bacteria simbiote *Photorhabdus luminescens* del nemátodo entomopatógeno

Heterorhabditis bacteriophora. Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. Honduras. 14 p.

Badii, M. H. y Abreu, J. L. 2006. Control biológico una forma sustentable de control de plagas (Biological control a sustainable way of pest control). International Journal of Good Conscience. 1(1): 82-89.

Bahena, J. F. 2008. Enemigos naturales de las plagas agrícolas del maíz y otros cultivos. Texcoco. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). p: 21-27.

Baird-Parker, A.C. 1962. An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase-positive staphylococci. Journal of Applied Microbiology. 25(1): 12-19.

Balakrishnan, G. S., Cheruvandasseri, A. J., Jinachandrannair V. S., Moochattil R., Basheerkutty S., y Chellappan M. 2016. Molecular characterization and amplified ribosomal DNA restriction analysis of entomopathogenic bacteria associated with *Rhabditis (Oscheius)* spp. 3 Biotech. 6(1):32.

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

Bintrim, S.B., Ensign, J.C. 1998. Insertional inactivation of genes encoding the crystalline inclusion proteins of *Photorhabdus luminescens* results in mutants with pleiotropic phenotypes. Journal of Bacteriology. 180: 1261–1269.

Blackburn, D., Wood, P. L. Jr., Burk, T. J., Crawford, B., Wright, S. M. y Adams, B. J. 2016. Evolution of virulence in *Photorhabdus* spp., entomopathogenic nematode symbionts. Systematic and Applied Microbiology 39: 173–179

Boemare N. E. 1996. The entomopathogenic nematode-bacterium complex: biology, life cycle and vertebrate safety. Biocontrol Science Technology 6:333–346.

Boemare N. E., Akhurst R. J., Mourante R. G. 1993. DNA relatedness between *Xenorhabdus* spp. (*Enterobacteriaceae*), symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes, and a proposal to transfer *Xenorhabdus luminescens* to a new genus *Photorhabdus* ge. Nov. International Journal of Systematic Bacteriology, 43 (2): 249-255.

Boemare N. E., Laumond C. y Mauleon H. 1996. The entomopathogenic nematode bacterium complex: biology, life cycle and vertebrate safety. Biocontrol Science and Technology. 6: 33-34.

Boemare N.E. 1993. DNA relatedness between *Xenorhabdus* spp. (*Enterobacteriaceae*), symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes, and a proposal to transfer *Xenorhabdus luminescens* to a new genus, *Photorhabdus* gen. nov. International Journal of Systematic Bacteriology 43:249–255.

Boemare, N. E. 2002. Biology, Taxonomy and Systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. En: Entomopathogenic nematology. CAB International 2002. (Ed.) R. Gaugler. p. 311-326.

Boemare, N. E. y Akhurst, R. J. 1988. Biochemical and physiological characterization of colony form variants in *Xenorhabdus* spp. (*Enterobacteriaceae*). Journal of General Microbiology. 134:751–761.

Boemare, N., Givaudan, A., Brehelin, M. y Laumond, C. 1997. Symbiosis and pathogenicity of nematode bacterium complexes. Symbiosis. 22: 2145.

Bowen, D.J., Ensign, J.C. 2001. Isolation and characterization of intracellular protein inclusions produced by the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. Applied and Environmental Microbiology. 67: 4834–4841.

Bucher, G. E. 1960. Potential bacterial pathogens of insects and their characteristics. Journal of Invertebrate Pathology 2: 172–193.

Burnell, A. M. y Stock, S. P. 2000. *Heterorhabditis*, *Steinernema* and their bacterial symbionts – Lethal pathogens of insects. Nematology. 2(1): 31–42.

Campbell, L. R. y Gaugler, R. 1991. Mechanisms for exsheathment of entomopathogenic nematodes. *International Journal Parasitology*. 21: 219-224.

Campos-Herrera, R., Tailliez, P., Pagès, S., Ginibre, N., Gutiérrez, C. Boemare, N. E. 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: 173–181

Castro, I. R. 2014. Nemátodos entomopatógénos en cultivos de caña de azúcar del estado de Morelos. Tesis para obtener el grado de Maestro en Biotecnología. Universidad Autónoma del Estado De Morelos.

Ciche, T. A. 2007. The biology and genome of *Heterorhabditis bacteriophora*. *WormBook*. (Ed.) The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.135.1, <http://www.wormbook.org>.

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.

Ciche, T.A. y Ensign, J.C. 2003. For the insect pathogen *Photorhabdus luminescens*, which end of a nematode is out?. *Applied and Environmental Microbiology*. 69 (4): 1890–1897.

Coomans, A. 2000. Nematode systematics: past, present and future. *Nematology*, 2 (1): 3-7.

Couche, G., Gregson, R., 1987. Protein inclusions produced by the entomopathogenic bacterium *Xenorhabdus nematophilus* subsp. *nematophilus*. *Journal of Bacteriology*. 169: 5279–5288.

Cruz, K. 2015. Evaluación de producción *in vivo* de tres cepas de nemátodos entomopatógénos aislados en Morelos. Tesis para obtener el grado de Ingeniero en Biotecnología. Universidad Politécnica del Estado de Morelos.

De Ley, P. 2000. Lost in worm space: phylogeny and morphology as road maps to nematode diversity. *Nematology*, 2(1): 9-16.

De Ley, P. y Blaxter, M. L. 2002. Systematic position and phylogeny. En: *The Biology of Nematodes*. D.L. Lee. (Ed.) London: Taylor and Francis. 30 p.

Demain, A.L. y Fang, A. 2000. The natural functions of secondary metabolites. En: Fletcher, A. (Ed.) *History of Modern Biotechnology*, I. Springer, Berlin Heidelberg.

Dillman, A. R., Chaston, J. M., Adams, B. J., Ciche, T. A., Goodrich-Blair, H., Stock, S. P., et al. 2012. An entomopathogenic nematode by any other name. *PLoS Pathogens*. 8(3): e1002527. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002527> PMID: 22396642

Doetsch, N. 1981. Determinative methods of light microscopy. En: *Manual of Methods for General Microbiology*. Gerhardt P. (Ed), American Society of Microbiology, Washington. p 21-33.

Dunphy, G. B. y Webster J. M. 1988. Virulence mechanisms of *Heterorhabditis heliothidis* and its bacterial associate, *Xenorhabdus luminescens* in non-immune larvae of the greater wax moth *Galleria mellonella*. *International Journal Parasitology*, 18: 729-737.

Edwards, P. R. y Ewing, W. H. 1986. *Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae*. (Ed) Elsevier, Nueva York. 536p.

Ehlers R. U. 2001. Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56: 623–633.

Ehlers R.U. 1990. The influence of phase variants of *Xenorhabdus* spp. and *Escherichia coli* (Enterobacteriaceae) on the propagation of entomopathogenic nematodes of the genera *Steinernema* and *Heterorhabditis*. *Rev. Nematol* 13:417–424.

Ehlers, R. U. 1996. Current and future use of nematodes in biocontrol: Practice and commercial aspects with regard to regulatory policy issues. *Biocontrol Science and Technology* 6 (3): 303–316.

Ffrench-Constant, R., Waterfield, N. 2006. An ABC guide to the bacterial toxin complexes. *Advances in Applied Microbiology*. 58:169-183.

Ffrench-Constant, R.H., Waterfield, N., Daborn, P., Joyce, S., Bennett, H., Au, C., Dowling, A., Boundy, S., Reynolds, S. y Clarke, D. 2003. *Photorhabdus*: Towards a functional genomic analysis of a symbiont and pathogen. *FEMS Microbiology Reviews* 26: 433-456.

Forst, S., Clarke, D. 2002. Bacteria nematode symbiosis. En: *Entomopathogenic nematology*. CAB International 2002. (Ed.) R. Gaugler. p. 57-77

Forts, S. y Nelson, K. 1996. Molecular Biology of the Symbiotic-Pathogenic Bacteria *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp. *Microbiological Reviews*. 60(1): 21-43.

Gaugler, R. y Kaya, H. K. 1990. *Entomopathogenic nematodes in biological control*. Boca Raton, FL. CRC Press.

Georgis R. y Gaugler R. 1991. Predictability in biological control using entomopathogenic nematodes. *Journal of Economic Entomology*. 84: 713-720.

Glazer, I. y Lewis, E .E. 2000. Bioassays of entomopathogenic nematodes. En *Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes*. Bet Dagan, Israel. CABI Publishing, Wallingford, UK. p.229-247.

González, F. y Bernal, I. A. 2000. *Impacto social del uso de los plaguicidas en el mundo*. Universidad de Matanzas. 24p.

Gouge, D. H., Snyder, J. L. 2006. Temporal association of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: *Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*) and bacteria. *Journal of Invertebrate Pathology*. 91:147-157.

Grewal, P. S. 1999. Production, formulation y quality. *Optimal use of insecticidal nematodes in pest management*. P. 15.24.

Grewal, P. S. y Georgis, R. 1999. Entomopathogenic nematodes. En: Hall, F. R. y J. J. Menn. (Ed.) *Methods Biotechnology. Biopesticides: Uses and Delivery*. p. 271-299.

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

Guadarrama, A. T. M. 2015. Respuesta de tres cepas de nemátodos entomopatógenos expuestos a agroquímicos sobre *Diatraea magnifactella* Dyar. Tesis para obtener el grado de Ingeniero en Biotecnología. Universidad Politécnica del Estado de Morelos.

Guédez C., Castillo C., Cañizales L. y Olivar R. 2008. Control biológico: una herramienta para el desarrollo sustentable y sostenible. *Control Biológico*. 7(13): 50 – 74.

Guerra, B. E., Chacón, J. G., Muñoz, J. E. y Caicedo, A.M. 2014. Evaluación de la patogenicidad de *Xenorhabdus* spp. nativos en Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 16(1): 111-118.

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

Haukeland, S. 1993. Entomopathogenic nematodes found in Norway. *Norwegian Journal of Agricultural Sciences*, 7: 17–27.

Hazir, S., Kaya, H. K., Stock, S. P. y N. Keskin. 2003. Entomopathogenic nematodes (*Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*) for biological control of soil pests. *Turkish Journal of Biology* 27:181–202.

Kaya H. K., Gaugler R. 1993. Entomopathogenic nematodes. *Annual Review of Entomology*. 38: 181-206.

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

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

Klein, M. G. 1990. Efficacy against soil- inhabiting insects pest. En: Gaugler, R. y Kaya, H. K. (Ed.) Entomopathogenic nematodes in biological control. Boca Raton FL. CRC Press. p. 195-214.

Kontnik, R., Crawford, J.M., Clardy, J. 2010. Exploiting a global regulator for small molecule discovery in *Photorhabdus luminescens*. ACS Chemical Biology 5(7): 659–665.

Kumar, S. N., Mohandas, C. y Nambisan, B. 2014a. Cyclo(L -Pro-D-Arg): a new antibacterial and antitumour diketopiperazine from *Bacillus cereus* associated with a rhabditid entomopathogenic. Folia Microbiologica 59: 197-202.

Kumar, S. N., Mohandas, C. y Nambisan, B. 2014b. Purification, structural elucidation and bioactivity of tryptophancontaining diketopiperazines, from *Comamonas testosteroni* associated with a rhabditid entomopathogenic nematode against major human-pathogenic bacteria. Peptides 53: 48-58.

Lee, M-M. y Stock S. P. 2010. A multigene approach for assessing evolutionary relationships of *Xenorhabdus* spp. (γ -Proteobacteria), the bacterial symbionts of entomopathogenic *Steinernema* nematodes. Journal of Invertebrate Pathology. 104:67-74.

Lewis, E. E., Clarke, D. J. 2012. Nematode parasites and entomopathogens. En: Vega FE, Kaya HK, editors. Insect Pathology. 2a ed: Elsevier. p. 395–424.

Marchesi, J. R., Sato, T., Weightman, A. J., Martin, T. A., Fry, J. C., Hiom, S. J. y Wade, W. G. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16s rRNA. Applied and Environmental Microbiology 64: 795–799.

Nealson, K. H., Schmidt, T. M. y Bleakley, B. 1990. Physiology and biochemistry of *Xenorhabdus*. En: R. Gaugler y H. K. Kaya. (Ed.) Entomopathogenic nematodes in Biological Control. CRC Press, Boca Raton, FL. p.271–284.

Nguyen, K. B., Hunt, D. J. 2007. Entomopathogenic nematodes: systematics, phylogeny and bacterial symbionts. En: Hunt DJ, Perry RN. (Ed.) Leiden-Boston: Brill.

Nicholls, C. I. 2008. Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico. Medellín, Colombia. (Ed.) Universidad de Antioquia.

Nübel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R., Ludwig, W. y Backhaus, A. 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. Journal of Bacteriology 178: 5636–5643.

Orozco, R. A., Molnár, I., Bode, H. y Stock, P. 2016. Bioprospecting for secondary metabolites in the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens* subsp. *Sonorensis*. Journal of Invertebrate Pathology 141: 45–52.

Pérez, B. Y., Márquez, G. M. y Gómez, M. 2006. Caracterización de la fase primaria de las bacterias simbiotes de los nemátodos entomopatógenos *Steinernema cubanum*, *Heterorhabditis indica* y *Heterorhabditis bacteriophora*. Fitosanidad. 10(3): 193-195.

Peters, A. y Ehlers, R.U. 1994. Susceptibility of leatherjackets (*Tipula paludosa* y *Tipula oleraceae*; Tipula: Nematocera) to the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae*. Journal of Invertebrate Pathology. 63: 163-171.

Poinar Jr., G.O. 1966. The presence of *Achromobacter nematophilus* in the infective stage of a *Neoplectana* sp. (Steinernematidae: Nematoda). Nematologica. 12: 105–108.

Poinar Jr., G.O., Thomas, M., 1966. Significance of *Achromobacter nematophilus* Poinar and Thomas Achromobacteriaceae, Eubacteriales in the development of the nematode, DDI36 *Neoplectana* sp., Steinernematidae. Parasitology 56, 385– 390.

Poinar, G. O. Jr. 1979. Nematodes for biological control of insects. Boca Raton, FL. CRC Press. 277p.

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

Poinar, G. O. Jr. 1990. Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. En Gaugler, R. & H. K. Kaya (Ed.) *Entomopathogenic nematodes in biological*. Boca Raton, FL, CRC Press. p.23-61.

Poinar, G. O., Thomas, G. Jr., Haygood, M. y Neelson, K. H. 1980. Growth and luminescence of the symbiotic bacteria associated with the terrestrial nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. *Soil Biology & Biochemistry*. 12:5-10.

Poinar, Jr. G. O. 1976. Description and biology of a new insect parasitic Rhabditoid, *Heterorhabditis bacteriophora* n. gen., n. sp. (Rhabditida; Heterorhabditidae N. Fam.). *Nematologica*, 21: 463-470.

Poinar, Jr., G.O., Thomas, G.M., Hess, R., 1977. Characteristics of the specific bacterium associated with *Heterorhabditis bacteriophora* (Heterorhabditidae: Rhabditida). *Nematologica*. 23: 97-102.

Rovesti, L. y Deseo, K.V. 1990. Compatibility of chemical pesticides with the entomopathogenic nematodes, *Steinernema carpocapsae* Weiser and *S. feltiae* Filipjev (Nematoda: Steinernematidae). *Nematology*. 36: 237-245.

Ruiu, L. 2015. Insect Pathogenic Bacteria in Integrated Pest Management: A review. *Insects*. 6: 352-367.

Salvadori, J., Schumacher, M., Ligabue-Braun, R., Yamazaki, E., Salvadori, J. R. y Carlini, C. R. 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: 253-263.

Shapiro-Ilan, D. I. y Gaugler R. 2002. Production technology for entomopathogenic nematodes and their bacterial symbionts. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28: 137–146

Singh, J., Banerjee, N. 2008. Transcriptional analysis and functional characterization of a gene pair encoding iron-regulated xenocin and immunity proteins of *Xenorhabdus nematophila*. *Journal of Bacteriology*. 190:3877-3885.

Smigielski, A.J., Akhurst, R.J., Boemare, N.E., 1994. Phase variation in *Xenorhabdus nematophilus* and *Photorhabdus luminescens*: differences in respiratory activity and membrane energization. *Applied and Environmental Microbiology*. 60: 120–125.

Sotelo, F. J., Peña, G., Hernández, V. M. y Lina, L. P. 2013. Las plagas bajo control: nematodos entomopatógenos. *Hypatia*. 55Morelos, México.

Staunton, J. y Weissman, K. J.2001. Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Natural Product Reports*. 18:380-416.

Stock, P. 2015. Diversity, biology and evolutionary relationships. En: R. Campos-Herrera (Ed.). *Nematode Pathogenesis of Insects and Other Pests*. New York: Springer. Pp. 3-27.

Stock, S. P. 1998. Sistemática y biología de nemátodos parásitos y asociados a insectos de importancia económica. En: Universidad Nacional del Litoral. (Ed.) *Esperanza*, Santa Fe. p.106.

Stock, S. P., Mráček, Z., y Webster, J. M. 2000. Morphological variation between allopatric populations of *Steinernema kraussei* (Steiner, 1923) (Rhabditida: Steinernematidae). *Nematology* 2(2): 143-152.

Stock, S.P., Rivera-Orduño, B., Flores-Lara, Y., 2009. *Heterorhabditis sonorensis* n. sp. (Nematoda: Heterorhabditidae), a natural pathogen of the seasonal cicada *Diceroprocta ornea* (Walker) (Homoptera: Cicadidae) in the Sonoran desert. *Journal of Invertebrate Pathology* 100, 175–184.

Susurluk, A. 2006. Effectiveness of the Entomopathogenic Nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema feltiae* against *Tenebrio molitor* (Yellow Mealworm) Larvae in Different Soil Types at Different Temperatures. Turkish Journal of Biology 30: 199-205.

Tanada, Y. y Kaya, H. K. 1993. Nematodes, nematomorphs, and plathelminthes. En: Insect pathology. Chapter 13. San Diego, USA, Academic Press, p.666.

Thaler, J. O., Baghdiguian, S., Boemare, N. 1995. Purification and characterization of Xenorhabdicolin, a phage tail-like bacteriocin, from the lysogenic strain F1 of *Xenorhabdus nematophilus*. Applied and Environmental Microbiology. 61:2049-2052.

Torres-Barragan, A., Suazo, A., Buhler, W. G., Cardoza, Y. J. 2011. Studies on the entomopathogenicity and bacterial associates of the nematode *Oscheius carolinensis*. Biological Control. 59:123-129.

Van Driesche, R. G., Hoddle, M. S., Center, T. D., Ruíz, C. E., Coronada, B. J., Manuel, A. J. 2007. Control de plagas y malezas por enemigos naturales. Washington. U. S. D. A. p: 3-46.

Van Lanen, S. G. y Shen, B. 2008. Advances in polyketide synthase structure and function. Current Opinion in Drug Discovery & Development. 11:186-195.

Weisburg, G. W., Barns, S. M. Pelletier, D. A. y Lane, D. J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology. 173:697- 703.

Woodring, J. L. y Kaya H. K. 1988. Steinernematid and Heterorhabditid nematodes: A handbook of biology and techniques. Southern Cooperative Series Bulletin 331. Fayetteville, AR, USA: Arkansas Agricultural.

Wouts, W. M. 1991. *Steinernema* (Neoaplectana) and *Heterorhabditis* species. En: Manual of agricultural nematology. Nickle, W. R. (Ed.). New York. Marcel Dekker. p. 855-897.

Ye, W. M., Torres-Barragan, A., Cardoza, Y. J. 2010. *Oscheius carolinensis* n. sp (Nematoda: Rhabditidae), a potential entomopathogenic nematode from vermicompost. *Nematology*. 12:121–135.

Zhang, C., Liu, J., Sun, J., Yang, S., An, X., *et al.* 2008. *Heterorhabditoides chongmingensis* gen. nov., sp. nov. (Rhabditida: Rhabditidae), a novel member of the entomopathogenic nematodes. *Journal of Invertebrate Pathology*. 98:153–168.

11. ANEXOS

11.1 Secuencias de ADN

>MC5-R

GGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAA
GACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAG
GTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTG
GAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGC
AAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGA
GGAGGAAGGTGGTGTGAGCTTAATACGTTTCATCAATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAA
CTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAA
GCGCACGCAGGCGGTTTTGTTAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTT
GAACTGGCAAGCTAGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
GAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCG
AAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGCTAGTCCACGCTGTAACGATGTCGATTTG
GAGGTTGTGCCCTTGATGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTAC
GGCCGCATGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGGCTCCGCCCAARCGGTGGAACATGTGGT
TTAATTCSTRATG

>DS-R

GGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCA
AGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTA
GGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACT
GGAAGTGTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCG
CAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCG
AGGAGGAAGGTGGTGTGAGCTTAATACGCTCATCAATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCT
AACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTA
AAGCGCACGCAGGCGGTTTTGTTAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCAT
TTGAAACTGGCAAGCTAGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCG
TAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTG
CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACGATGTCGATTT
GGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAG
TACGGCCGAGGTTAAACTCAATGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCCGGTGGAGCATGTGG
TTTAATTCKATTGCAACGCGAAGAAMCCTTACCTAACTCTTGACATGCAAAGAACTTTCAGAAAG
AGGGATTTGGTGTCTTTCGGGAACTCGGAGAMCKAGAGGCTGCATGGGCTTGTCTCAR

>MC2-B

GTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAATATTTTGA
CTGCATGGTTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTA
GCTAGTAGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCG
GCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGCG

AATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTC
TGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAG
CCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTAT
TGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGG
AGGGTCATTGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGT
GAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCTTCTCATTCTGTA ACTGACAC
TGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCGTAAACGA
TGAGTGCTAAGTGTTAGAGGTACATCCRCCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACSCATTAARCACTCCCG
CCTGGGGAGTACGGGCCGAGGCTGGAAACTCAAAGGGAATTGAC

>DS-B

AACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACC
GCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTTCGGCTGTCACTTACRGATGGACCCGCGGCGCATRGC
TRGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCRAGGSGASGATGCGTAGSCGASCTGAGAGGGTGATSGGC
CACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAAT
GGACRAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGT
TGTTAGGGAAGAACAAGTGCGAGAGTAACTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCA
CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGG
GCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAG
GGTCATTGAAACTGGGAAACTTG



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 30 de Noviembre del 2018

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez (Tutor principal)
Dr. Iván Arenas Sosa (Co Tutor)
Dra. Verónica Obregón Barboza
Dr. Luis Caspeta Guadarrama
Dr. Guadalupe Peña Chora

Tesis: "Aislamiento y caracterización de las bacterias simbiotes de los nemátodos entomopatógenos *Heterorhabditoides chongmingensis*, *Oscheius myriophila* y *Caenorhabditis brenneri*."

Alumno que la presenta a revisión: **KARINA CRUZ PEREZ**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

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

ATENTAMENTE

DR. VICTOR MANUEL HERNANDEZ VELAZQUEZ



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 30 de Noviembre del 2018

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez (Tutor principal)
Dr. Iván Arenas Sosa (Co Tutor)
Dra. Verónica Obregón Barboza
Dr. Luis Caspeta Guadarrama
Dr. Guadalupe Peña Chora

Tesis: "Aislamiento y caracterización de las bacterias simbiotes de los nemátodos entomopatógenos *Heterorhabditoides chongmingensis*, *Oscheius myriophila* y *Caenorhabditis brenneri*."

Alumno que la presenta a revisión: **KARINA CRUZ PEREZ**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

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

ATENTAMENTE

DR. IVAN ARENAS SOSA



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 30 de Noviembre del 2018

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez (Tutor principal)
Dr. Iván Arenas Sosa (Co Tutor)
Dra. Verónica Obregón Barboza
Dr. Luis Caspeta Guadarrama
Dr. Guadalupe Peña Chora

Tesis: "Aislamiento y caracterización de las bacterias simbiotes de los nemátodos entomopatógenos *Heterorhabditoides chongmingensis*, *Oscheius myriophila* y *Caenorhabditis brenneri*."

Alumno que la presenta a revisión: **KARINA CRUZ PEREZ**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

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

ATENTAMENTE

DRA. VERONICA OBREGON BARBOZA



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 30 de Noviembre del 2018

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez (Tutor principal)
Dr. Iván Arenas Sosa (Co Tutor)
Dra. Verónica Obregón Barboza
Dr. Luis Caspeta Guadarrama
Dr. Guadalupe Peña Chora

Tesis: "Aislamiento y caracterización de las bacterias simbiotes de los nemátodos entomopatógenos *Heterorhabditoides chongmingensis*, *Oscheius myriophila* y *Caenorhabditis brenneri*."

Alumno que la presenta a revisión: **KARINA CRUZ PEREZ**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

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

ATENTAMENTE

DR. LUIS CASPETA GUADARRAMA



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 30 de Noviembre del 2018

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez (Tutor principal)
Dr. Iván Arenas Sosa (Co Tutor)
Dra. Verónica Obregón Barboza
Dr. Luis Caspeta Guadarrama
Dr. Guadalupe Peña Chora

Tesis: "Aislamiento y caracterización de las bacterias simbiotes de los nemátodos entomopatógenos *Heterorhabditoides chongmingensis*, *Oscheius myriophila* y *Caenorhabditis brenneri*."

Alumno que la presenta a revisión: **KARINA CRUZ PEREZ**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

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

ATENTAMENTE

DR. GUADALUPE PEÑA CHORA