UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN BIOTECNOLOGÍA

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS SOBRE *Scyphophorus acupunctatus* EN CULTIVOS DE NARDO EN EL ESTADO DE MORELOS

TESIS

PARA OBTENER EL TITULO DE:

MAESTRIA EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A:

Biol. Thania Gisel Rodríguez Ocampo

DR.VICTOR MANUEL HERNÁNDEZ VELÁZQUEZ

DIRECTOR DE TESIS

DR.RENATO LEÓN RODRÍGUEZ

CO-DIRECTOR DE TESIS

CEIB
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA UAEM

CUERNAVACA MORELOS **OCTUBRE 2026**

DEDICATORIA

A ti, que te convertiste en mi mayor inspiración y en la fuerza principal de este camino. Este logro lleva tu nombre grabado, porque cada esfuerzo tuvo como fin construir un mejor futuro para ti. Gracias por ser mi luz, mi motor y la razón por la cual nunca me rendí. Todo lo que soy y lo que alcanzo es por y para ti.

Eythan Gael

Te amo hijo

A dios por haber puesto en mi camino a dos personas maravillosas y únicas, MIS PADRES ¡¡Wenses Rodríguez Sánchez & Eloína Ocampo Flores!! Porque gracias a su cariño, guía y apoyo realice un logro más de mi vida, fruto del inmenso apoyo, amor y confianza, este éxito también es SUYO.

A mi esposo Javier Sollano, gracias por tu paciencia, comprensión y palabras de aliento que me motivaron en los momentos de desánimo. Gracias por estar siempre a mi lado y celebrar cada logro conmigo.

Shanel Rodríguez, hermanita gracias por siempre estar conmigo por apoyarme y siempre tener un consejo, por apoyarme en los momentos más difíciles, te amo hermana y gracias por siempre estar a mi lado.

Lizeth Cortez, muchas gracias por acompañarme y aconsejarme en todo momento, gracias por todo el apoyo y cariño brindado en cada momento.

Mis abuelitos Lucio Rodríguez y Margarita Sánchez, gracias por siempre estar para mi por acompañarme y aconsejarme por nunca dejarme sola y siempre estar para mi en cada paso.

AGRADECIMIENTOS

CON ADMIRACIÓN Y RESPETO

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

Dr. Renato León Rodríguez, mi más amplio agradecimiento por su conocimiento, paciencia, tiempo, guía, y dedicación que me brindo durante este proyecto. Muchas gracias por siempre estar pendiente a cualquier observación, por la comprensión y apoyo incondicional en todo momento.

A cada miembro de mi comité evaluador, Dr. Guadalupe Peña Chora, Dra. Susana Valencia Díaz y Dr. Erubiel Toledo Hernández, por estar pendiente a cualquier observación, por su enorme conocimiento y aportación en este proyecto, muchas gracias.

ÍNDICE 4

1.INTRODUCCIÓN.....1
2. ANTECEDENTES 3
2.1 Cultivos de nardo (Polianthes tuberosa L.).....3
2.2 Picudo del Nardo (*Scyphophorus acupunctatus*).....3
2.3 Nematodos entomopatógenos 5
2.4 Morfología de los nematodos entomopatógenos.....5

2.5 Ciclo de vida de los nematodos entomopatógenos 6
2.6 Asociación nematodo-bacteria 8
2.8 Aislamientos e identificación de nematodos entomopatógenos en México 9
3. JUSTIFICACIÓN 11
4. HIPÓTESIS 12
5.OBJETIVOS 12
5.1 Objetivo general 12
5.2 Objetivos particulares 13
6. MATERIALES Y MÉTODOS 13
6.1 Ubicación del experimento 13
6.2 Colecta de las muestras 13
6.3 Aislamiento de nematodos entomopatógenos 15
6.4 Propagación y conservación de los nematodos entomopatógenos 16
6.5 Bioensayos de patogenicidad 16
6.5.1 Cuantificación de juveniles infectivos (J3) 16
6.6 Bioensayos de virulencia 17
6.7 Identificación Molecular 17
6.8 Identificación morfométrica 18
6.8.1 Fijación de nematodos entomopatógenos para su identificación morfológica 19
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 20
7.1 Nematodos entomopatógenos aislados de las parcelas de estudio 20
7.2 identificación molecular 20
7.3 identificación morfológica 22
7.4 Bioensayos de patogenicidad 27
7.3 Bioensayos de virulencia 29
8. CONCLUSIÓNES 31
9. BIBLIOGRAFIA 32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida del picudo del nardo (*Scyphophorus acupunctatus*) ……4

Figura 2. Esquema de la morfología general de un nematodo macho y de una hembra (Tomado de Navone et al., 2017)……6

Figura 3. Ciclo de vida de los nematodos entomopatógenos. (Tomado de Grewal y Georgis,1999)……8

Figura 4. Bacterias dentro del nematodos entomopatógenos. A) *Photorhabdus luminescens* colonizando el intestino del nematodo entomopatógeno *H. bacteriophora* B) Vesícula de nematodo entomopatógeno *S. carpocapsae* colonizado por *Xenorhabdus nematophila* (Ciche et al., 2006)……9

Figura 5. A) Suelo de nardo que año con año se siembre carretera Cuautla, B) Cultivo de nardo Tepalcingo Mor, C) Nardo infectado por larva del picudo……14

Figura 6. Bulbo de nardo infectado por una larva de *Scyphophorus acupunctatus* ……..15

Figura. 7 En las siguientes imágenes A y B se muestran larvas de *G. mellonella* infectadas por nematodos entomopatógenos……16

Figura 8. Árbol filogenético basado en la secuencia de DNA de la región ITS1-5.8S-ITS2 de los nematodos aislados LI, L3, L5, T4, TG1 y CGM (en letras negritas) y secuencias de otras cepas de *Metarhabditis amsactae*, así como de otras especies de nematodos obtenidas de GenBank. Se incluyó *Caenorhabditis elegans* AS como grupo externo. El árbol se construyó utilizando el método de Neighbor-Joining……22

Figura 9. Características morfológicas de una hembra de *Metarhabditis amsactae* bajo el microscopio óptico. A) Región anterior: se aprecian los labios, el esófago, el bulbo basal y el anillo nervioso. B) Región media: se identifican el intestino y la presencia de un huevo. C) Región posterior: se señalan la vagina, el intestino, el ano y la cola……..23

Figura 10. Características morfológicas de una hembra de *Metarhabditis amsactae* bajo el microscopio óptico. A) Región anterior: se aprecian los labios, el esófago, el bulbo basal y el anillo nervioso. B) Región media: se identifican el intestino y la presencia de un huevo. C) Región posterior: se señalan la vagina, el intestino, el ano y la cola……24

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especies de nematodos entomopatógenos aislados en México……..……11

Tabla 2. Aislamientos positivos de nematodos entomopatógenos……..……21

Tabla 3. Morfometría de *Metarhabditis amsactae……..26*

Tabla 4. Comparación de rangos de morfometrías en machos de *Metarhabditis amsactae……..26*

Tabla 5. Comparación de rangos de morfometrías en hembras de *Metarhabditis amsactae……...27*

Tabla 6. Mortalidad de larvas *Tenebrio mollitor* con 60 J3. Se muestra su promedio y desv. estándar. Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey……28
28

Tabla 7. Mortalidad de larvas *Tenebrio mollitor* con 80 J3. Se muestra su promedio y desv. estándar. Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey……..29

Tabla 8. CL50 sobre larvas de *Tenebrio mollito*r de los aislados de NEP con el análisis Probit, con sus respectivos intervalos de confianza. ……30

ÍNDICE DE GRAFICAS

Grafica 1 En el eje X se representan los tratamientos correspondientes al grupo control y a los siete aislados evaluados (TG1, T4, L1, L3, L5, CGM y PCH9), mientras que en el eje Y se muestra el porcentaje de mortalidad acumulada en un intervalo de 0.00 % a 70.00 %. Las letras situadas sobre cada barra corresponden a la prueba de comparación de medias; letras distintas (A, B, C) indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$)……28

Grafica 2. En el eje X se representan los tratamientos correspondientes al grupo control y a los siete aislados evaluados (TG1, T4, L1, L3, L5, CGM y PCH9), mientras que en el eje Y se muestra el porcentaje de mortalidad acumulada en un intervalo de 0.00 % a 90.00 %. Las letras situadas sobre cada barra corresponden a la prueba de comparación de medias; letras distintas (A, B, C) indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$)……*29*

1.INTRODUCCIÓN

El nardo (Polianthes tuberosa L.) es una herbácea perenne perteneciente a la familia Agavaceae (Dole y Wilkins 2005). Es una planta ornamental bulbosa originaria de México que fue dispersada alrededor del mundo en el siglo XVI González *et al*. (2012). Ha ganado popularidad como flor de corte en varios países y se cultiva comercialmente en Kenia, Irán, India y México para exportar a países como Estados Unidos, Europa y Japón (Hassanpour *et al*., 2011) (Murrithi et al., 2011).

En México la mayor producción de nardo se concentra en los estados de Morelos, Guerrero, Veracruz y Puebla SIAP (2019). Así mismo, los nardos pueden verse afectados por diferentes plagas: como los pulgones, mosca blanca y la araña roja entre ellas destacando el picudo del nardo (*Scyphophorus acupunctatus*).

Para el control de *Scyphophorus acupunctatus* se han empleado diversos productos químicos que pueden ser dañinos tanto para la planta como para el humano, una alternativa es el control biológico, el cual consiste en el uso de enemigos naturales para el control de plagas; entre estos organismos se pueden encontrar: parasitoides, depredadores, hongos, bacterias, virus y nematodos. Dentro de los agentes de control microbiológico se destacan los nematodos entomopatógenos, estos son organismos parásitos obligados de insectos, sus estadios juveniles parasitan a sus hospederos, penetrando directamente la cutícula o a través de aperturas naturales como boca, ano y espiráculos; tienen una relación mutualista con bacterias de los géneros *Xenorhabdus, Photorhabdus* y *Serratia*, que se introducen junto con el parásito y se multiplican rápidamente matando al hospedero de 24 a 48 horas (Boemare, 2002).

En México los nematodos que se emplean como control biológico, la gran mayoría de especies disponibles en el mercado provienen de EE. UU, como lo son *Heterorhabditis bacteriophora, Heterorhabditis indica, Steinernema carpocapsae*, así mismo, la introducción de especies “exóticas” podría afectar a distribución de especies nativas, ya que estas podrían desplazar a especies locales (Nicholls,

2008). A pesar de su importancia de los nematodos como control biológico, existen pocos trabajos de aislamiento e identificación de especies en Morelos, así mismo, identificar especies nativas, nos permitirá ampliar el número de alternativas como agentes de control biológico. En el presente proyecto se realizó el aislamiento e identificación de nematodos entomopatógenos en suelos de cultivos de nardo del estado de Morelos. Así mismo, se evaluó su patogenicidad (capacidad de un microorganismo de causar una enfermedad) y virulencia (grado en que un patógeno puede causar una enfermedad) sobre larvas de ultimo estadio de *Tenebrio mollitor*.

2. ANTECEDENTES

2.1 Cultivos de nardo (Polianthes tuberosa L.)

Polianthes (familia Agavaceae) o comúnmente conocida como nardo, es nativo de México y se cultiva en muchos países por su agradable fragancia que le da una importancia ornamental y en la industria de la perfumería, suele multiplicarse por medio de tubérculos y crece hasta alcanzar unos 90 cm de altura, tiene un ciclo perene y florece desde verano hasta principios de otoño (Bharti et al., 2016). De acuerdo al servicio de información agroalimentaria y pesquera (SIAP) su producción en el país se encuentra en los estados de Guerrero, Oaxaca, Puebla, Veracruz y Morelos. Así mismo, en 2010 la superficie sembrada y cosechada del cultivo convencional de nardo en México fue de 266.00 hectáreas y para el año 2019 esta superficie de siembra y cosecha fue en aumento con 335.85 hectáreas, lo cual indica la producción de este cultivo va en aumento debido a su demanda (SIAP, 2019).

Siendo que esta planta tiene un alto potencial ornamental, tanto como flor de corte como en la industria de la perfumería, son necesarias medidas urgentes de conservación de sus especies, ya que, la reproducción del nardo se realiza a través de la selección o división de bulbos. Teniendo como principal plaga de importancia al picudo del nardo (Arroyo et al., 2010).

2.2 Picudo del Nardo (*Scyphophorus acupunctatus*)

Scyphophorus acupunctatus es una plaga severa del nardo (*P. tuberosa*), la larva se alimenta del bulbo causando grandes daños a los cultivos Camino *et al*. (2002). Uno de los principales problemas para el manejo de este insecto es que todo su ciclo biológico lo realiza en el interior de la planta, es decir, es de tipo críptico. El combate de los picudos se dificulta debido a distintos factores, ya que, los adultos machos producen una feromona que atrae a las hembras, una vez fecundadas, las hembras depositan sus huevecillos en un orificio que cavan en el bulbo de la planta; la nueva generación de adultos emerge después de aproximadamente 135 días

(Solís-Aguilar et al., 2001).

Para el control de esta plaga se han elaborado y aplicado de manera desordenada sustancias químicas, sin embargo, se considera que la aplicación sistemática de estas sustancias origina daños notables en el ambiente, la salud humana y el desarrollo de resistencia de plagas, siendo así una alternativa el control biológico con nematodos entomopatógenos (Gonzáles y Bernal, 2000).

Los nematodos entomopatógenos (NEP) podrían ser una alternativa para reducir las poblaciones de larvas y pupas, ya que varios aspectos de su ciclo de vida los hacen candidatos ideales para el control de los picudos. Los NEP han sido utilizados exitosamente para el control de especies relacionadas, incluyendo el picudo de los cítricos (*Diaprepes abbreviatus)*, picudo del nogal (*Curculio caryae*), picudo negro de la vida (*Otiorhynchus sulcatus*) (Grewal et al., 2005) y picudo grande del pino (*Hylobius abietis*) (Dillon et al., 2006), entre otros.



Figura 1. Ciclo de vida del picudo del nardo (*Scyphophorus acupunctatus*).

2.3 Nematodos entomopatógenos

Los nematodos entomopatógenos son agentes potenciales para control de plagas, pertenecen al Phylum Nematoda, de la clase Secernentea, del orden Rhabditida. Son organismos que han evolucionado a solo infectar insectos, teniendo un amplio rango de hospederos. Se caracterizan por ser denominados comúnmente como gusanos redondos o cilíndricos, son multicelulares, semitransparentes, no segmentados, anillados superficialmente y con simetría bilateral (Kaya y Stock, 1997).

Se consideran ocho familias de nematodos 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). 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 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).

2.4 Morfología de los nematodos entomopatógenos

Los nematodos entomopatógenos son organismos microscópicos que pueden medir de 0.1 mm a 2 mm, presentan un cuerpo cilíndrico no segmentado, referido como gusanos redondos. Cuentan con sistema excretor, nervioso, digestivo, reproductivo y muscular, carecen de sistema circulatorio y respiratorio. En la parte apical (apertura oral) se localiza el tracto alimenticio constituido por cavidad oral o estoma, esófago, en la parte media se localiza el intestino y en algunas especies las gónadas femeninas; en la parte posterior se localiza en recto y el ano.

Son organismos dioicos que presentan dimorfismo sexual y hay especies hermafroditas, con frecuencia el macho tiene un extremo posterior curvado o

helicoidal con espículas compilatorias y e(n algunas especies una bolsa caudal denominada bursa, así mismo, el extremo anterior del adulto puede tener ganchillos orales, dientes o placas en la cápsula bucal que sirven para la unión a tejidos; también pueden presentar pequeñas proyecciones de la superficie corporal conocidas como cerdas o papilas, que se cree que son de naturaleza sensitiva, las cuales se denominan anfidios, fasmidios o deiridios según la porción del cuerpo donde se localicen y son de importancia taxonómica (Poinar , 1979).

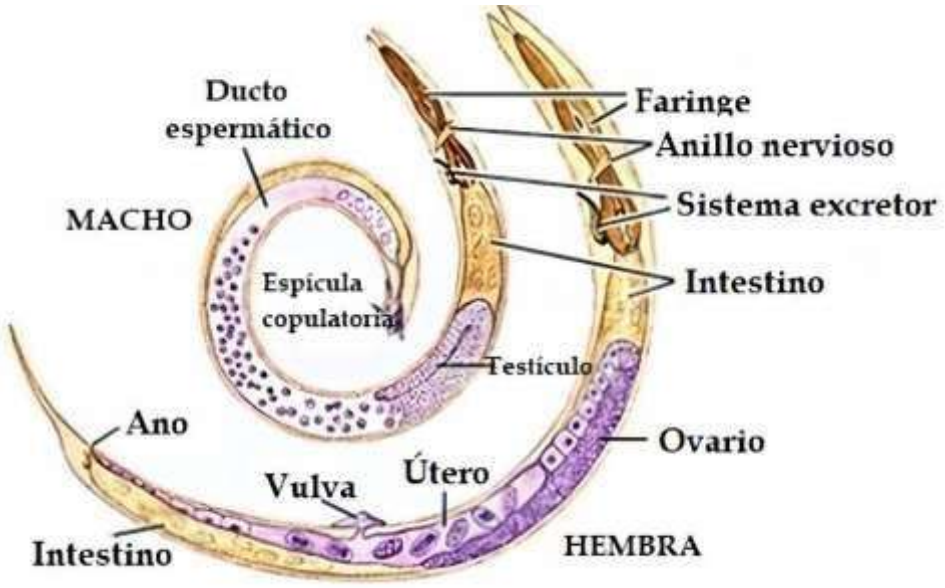


Figura 2. Esquema de la morfología general de un nematodo macho y de una hembra (Tomado de Navone et al*.,* 2017).

2.5 Ciclo de vida de los nematodos entomopatógenos

El ciclo de vida de los nematodos entomopatógenos es huevo y cuatro estadios juveniles, los estadios 1, 2 y 4 viven dentro del hospedero) y la etapa adulta Picoaga et al., (2007). El tercer estadio juvenil es el infectivo (J3), es la única fase del ciclo biológico del nematodo que se encuentra fuera del insecto; este estadio infectivo transporta la bacteria simbionte en su intestino, y es el encargado de sobrevivir en el medio hasta que localizar un hospedero (Poinar Jr 1993).

El ciclo infectivo de los NEP para su reproducción comienza con el tercer estadio juvenil que es el infectivo (J3) y tiene la capacidad de salir fuera del hospedero, este presenta dos diferentes estrategias para localizar a sus hospedadores.

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

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

Una vez localizado el hospedero el J3 ingresan a través de las aberturas naturales (boca, ano y espiráculos) una vez dentro este regurgita o defeca la bacteria en la hemolinfa del insecto, donde la bacteria prolifera en el cuerpo del insecto y alcanza altas densidades, en este punto produce diversos compuestos antimicrobianos que suprimen el crecimiento de microorganismos antagónicos creando así un ambiente favorable para la reproducción y desarrollo, así mismo estos se alimentan de la biomasa bacteriana y de los tejidos del insecto metabolizados por la bacteria (Koppenhofer y Fuzy 2006). Los nematodos entomopatógenos continúan su reproducción hasta que la reserva de alimento que proporciona el hospedero es insuficiente para continuar con un nuevo ciclo (el J3 adquiere la bacteria simbionte alimentándose de los tejidos del cadáver del insecto) (Stock 2015).

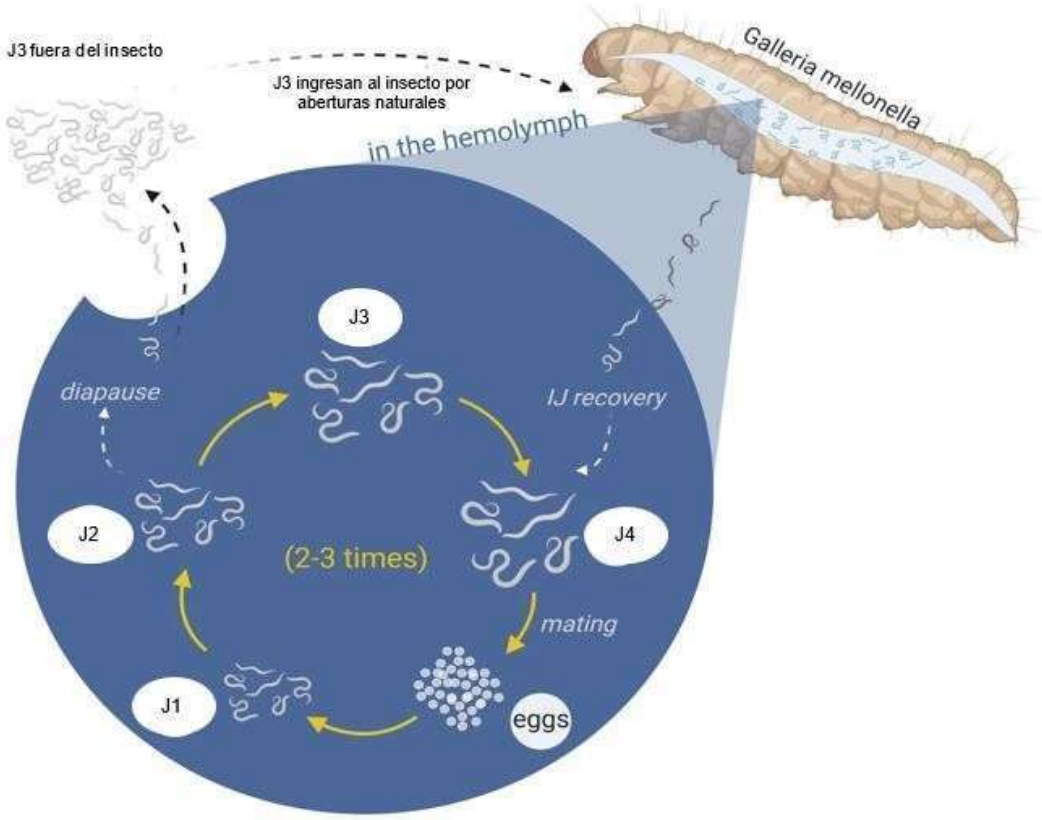


Figura 3. Ciclo de vida de los nematodos entomopatógenos (Tomado de Grewal y Georgis,1999).

Nota: (figura 3) observamos el ciclo vida de los nematodos entomopatógenos que se lleva a cabo dentro del hospedero, el cual comienza por huevo, cuatro estadios juveniles y el adulto. El estadio J3 es el único que puede estar fuera del hospedero y al encontrar un insecto ingresa por aberturas naturales, una vez dentro estos pueden tener de 2 a 3 generaciones.

2.6 Asociación nematodo-bacteria

Los nematodos entomopatógenos de las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae están asociados simbióticamente con bacterias de los géneros *Xenorhabdus* y *Photorhabdus*, respectivamente. Las bacterias se localizan en un receptáculo presente en la unión entre el esófago y el intestino, conocida como vesícula en el caso de los steinernemátidos, o en el lumen del intestino en heterorhabdítidos (Fig. 4) (Dunphy y Thurston 1990).

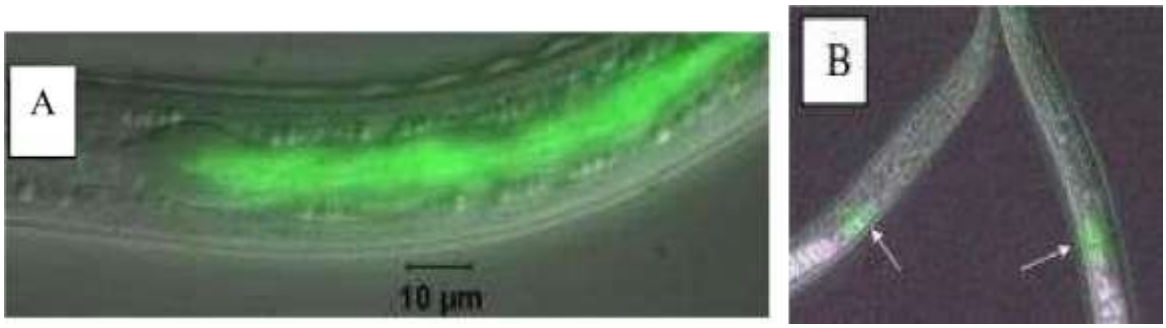


Figura 4. Bacterias dentro del nematodos entomopatógenos. A) *Photorhabdus luminescens* colonizando el intestino del nematodo entomopatógeno *H. bacteriophora* B) Vesícula de nematodo entomopatógeno *S. carpocapsae* colonizado por *Xenorhabdus nematophila* (Ciche et al*.,* 2006).

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

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

2.8 Aislamientos e identificación de nematodos entomopatógenos en México

Delgado, 2015 Aisló e identifico dos especies de nematodos entomopatógenos (*Steinernema websteri* y *Steinernema carpocapsae*) en campos cultivados con agave para el control de *Scyphophorus acupunctatus*. La eficacia de control de las

cepas fue determinada con larvas de *S. acupunctatus* expuestas a concentraciones de 100, 500 y 1000 juveniles infectivos (J3), donde las concentraciones que causaron las mayores mortalidades fueron 500 y 1000 J3 por larva en un rango que varió de 85 a 100% de mortalidad bajo condiciones de laboratorio. Las Concentraciones Letales medias (CL50) fueron de 168 J3 para S. *websteri* y 147 J3 de *S. carpocapsae*. Este estudio presenta el primer reporte de una cepa nativa de *S. websteri* en México, la cual es propuesta como agente de control biológico contra *S. acupunctatus*.

Villanueva et al., 2019 Reportó por primera vez la presencia de *Steinernema texanum* y *Heterorhabditis atacamensis* en suelos cultivados con nopal verdura en Milpa Alta, México, representando una herramienta biológica y potencial para el manejo de plagas en la zona. Romero et al., 2020 reportan una alta incidencia de nematodos del género Steinernema en suelos de caña de azúcar, similar a (Vidaurre, Rodríguez y Uribe 2020) que encontraron presencia del género en 19 de 20 muestras positivas, siendo el género Heterorhabditis el menos abundante.

Sin embargo, debido a que no todos los registros de aislamientos llegan hasta nivel de especie en el siguiente cuadro se mostraran algunos aislamientos en México y solo se hará énfasis en los registros hasta nivel taxonómico de especie y lugar de donde fueron aislados (Tabla 1).

Tabla 1. Especies de nematodos entomopatógenos aislados en México.

Especies	Sustrato	Lugar	Autor y año
Hetororhabditide indica	Suelo	Tabasco	(Adams, 2003)
	Suelo	Veracruz	(Grifaldo *et al.,* 2019)
	Suelo	Morelos	(Bruno *et al.,* 2020)
Hetororhabditide atacamensis	Suelo	Guanajuato	(Bruno *et al.,* 2020)

Hetororhabditide bacteriophora	Suelo	Zacatecas Guanajuato Morelos	(Bruno *et al.,* 2020) (Villanueva *et al.,*2017)
Hetororhabditide mexica	Suelo	Tamaulipas	(Nguyen *et al.,* 2004)
Steinernema riobrave	Suelo	Veracruz	(Bruno *et al.,*2020)
Steinernema feltiae	Suelo	Oaxaca	(Ruiz *et al.,*2003)
Steinernema carpocapsae	Suelo	Oaxaca Hidalgo	(Aquino *et al*.,2006)
Steinernema ralatorei *Steinernema bicornutum*	Suelo	Veracruz	(Grifaldo *et al.,*2017) (Grifaldo *et al.,*2019)
Steinernema diaprepesi	Suelo	Colima	(Molina *et al.,*2009)
Rhabditis blumi	Suelo	Sinaloa	(Leyva *et al.,*2018)
Pristionchus americanus	Suelo	Querétaro	(Montoya, 2012)

3. JUSTIFICACIÓN

Scyphophorus acupunctatus (Picudo del Nardo) es la principal plaga que causa daños en los cultivos de Nardo, Agave, Aloes y Yucas en Morelos, ya que, su reproducción y ovoposición ocurren en los bulbos causando daño mecánico y facilitando la entrada de microorganismos oportunistas que descomponen el tejido de la planta. Uno de los principales problemas para el manejo de este insecto es que todo su ciclo biológico lo realiza en el interior de la planta, es decir, es de tipo críptico, a pesar de que estas condiciones complican el manejo de la plaga, también

proporcionan condiciones para la utilización de nematodos entomopatógenos para su control que han sido utilizados exitosamente contra varias especies de picudos, así mismo, los nematodos entomopatógenos se podrían aplicar para reducir las poblaciones de larvas, pupas y adultos.

La mayoría de las especies de nematodos entomopatógenos disponibles en el mercado mexicano pertenecen a las familias Heterorhabditidae y Steinernematidae, destacando especies como *Heterorhabditis bacteriophora, Heterorhabditis indica* y *Steinernema carpocapsae*. Sin embargo, resulta fundamental aislar y estudiar especies nativas que puedan contribuir al control biológico de plagas en cultivos de interés regional. Esto no solo enriquecerá el conocimiento y la diversidad de nematodos entomopatógenos en México, sino que también abrirá nuevas oportunidades para desarrollar estrategias de manejo integrado de plagas adaptadas al contexto local. En este sentido, el presente trabajo resalta la importancia del cultivo de nardo, uno de los principales cultivos de flores de corte en Morelos, como modelo para estos estudios.

4. HIPÓTESIS

Los aislados de nematodos entomopatógenos colectados de suelo y en larvas de *Scyphophorus acupunctatus*, presentan diferencias en patogenicidad y virulencia sobre larvas de *Tenebrio molitor.*

5.OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar la identidad de los aislados de nematodos entomopatógenos obtenidos de suelo y larvas de *Scyphophorus acupunctatus* y evaluar su patogenicidad y virulencia sobre larvas de *Tenebrio molitor*.

5.2 Objetivos particulares

1. Aislar nematodos entomopatógenos en suelo y sobre picudo del agave *Scyphophorus acupunctatus* en cultivo de nardo en Morelos.
2. Identificar la identidad de los nematodos entomopatógenos aislados mediante técnicas morfométricas y moleculares.
3. Determinar la patogenicidad y virulencia de los nematodos entomopatógenos sobre *Tenebrio molitor.*

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Ubicación del experimento

La investigación se llevó a cabo en dos etapas: campo y en laboratorio.

Etapa de campo: se realizó en los municipios de Cuautla (18.9223415, -99.0163234) y Tepalcingo (18.5815235, 98.8164981) del estado Morelos dedicados al cultivo de nardo en las cuales se tomaron muestras de suelo en las localidades.

Etapa de laboratorio: se realizó en la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), en el laboratorio de Control Biológico del Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB) ubicado en campus Chamilpa.

6.2 Colecta de las muestras

Muestras de suelo: En los municipios de Cuautla y Tepalcingo, Morelos, se ubicaron cinco sitios de muestreo estratégicos (Fig. 5). La toma de muestra se realizó de forma manual con ayuda de una pala a una profundidad de 10 a 20 cm, recolectando un 1 kg de suelo por punto. Cada muestra se resguardo en bolsas y se etiquetaron con los datos correspondientes al área donde se realizo.



Figura 5. A) Suelo de nardo que año con año se siembre carretera Cuautla, B) Cultivo de nardo Tepalcingo Mor..

Colección de larvas de picudo de nardo: En el municipio de Tepalcingo Morelos se colectaron larvas que presentaron signos de infección (cambio de coloración o flacidez) directamente de los bulbos del nardo los cuales se obtuvieron tomando plantas que presentaran signos de infección por el picudo como cambio de coloración, deformación, marchitamiento, perforaciones en lavase de las hojas o desprendimiento fácil.



Figura 6. Bulbo de nardo infectado por una larva de *Scyphophorus acupunctatus*.

6.3 Aislamiento de nematodos entomopatógenos

De cada muestra de suelo se tomaron 300g y se colocaron de manera individual en botes de plástico de capacidad de 1L donde el suelo de cada muestra se homogenizo para desmoronar cepellones compactados y eliminar rocas que pudieran dañar al insecto cebo. El suelo se humedeció con agua destilada estéril procurando que la humedad quedara uniforme en todo el sustrato.

Se introdujeron 10 larvas de 5° y 6° estadio *Galleria mellonella* como insecto cebo en cada bote etiquetando con la información correspondiente de cada muestra, este se volteo de arriba hacia abajo todos los días durante 10 días con la finalidad de que las larvas se movilizaran, para facilitar la infección por los nematodos entomopatógenos presentes en el suelo, manteniéndose a temperatura ambiente aproximadamente de 27°C durante diez días (Sturhan et al., 2005).

Posteriormente a este periodo, se extrajeron las larvas de *G. mellonella* que presentaron signos de infección (larvas flácidas y que se tornan de color amarillo o rojo) que fueron revisadas con ayuda de un microscopio estereoscópico.

Se realizaron los postulados de Koch para verificar que los nematodos eran patógenos, las larvas cuya infección fue ocasionada por nematodos entomopatógenos se colocaron en trampas White previamente desinfectadas (Figura 7) (White, 1927). Por último, para su almacenamiento se colocaron en frascos de cultivo de tejido (Corning) con un volumen de 250 mL en condiciones de laboratorio.

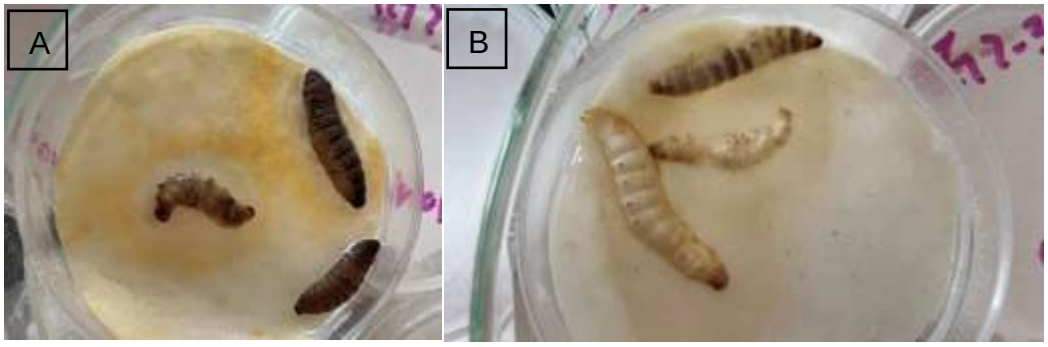


Figura 7. En las siguientes imágenes se muestran larvas de *Galleria mellonella* infectadas por nematodos entomopatógenos.

6.4 Propagación y conservación de los nematodos entomopatógenos

Con la finalidad de mantener las diferentes cepas aisladas, estas se propagaron y conservaron de la siguiente manera:

Se utilizaron cajas Petri (60x15mm) con un disco de papel filtro Whatman humedecido con agua destilada estéril. Sobre el papel se colocó una larva de *G. mellonella*, y se agregó 1000 µL de la suspensión de juveniles infectivos (J3) de las cepas aisladas.

Después de 14 días, las larvas se pasaron a trampa White, para la colecta de nematodos de cada aislado se tomaron con ayuda de una micro pipeta y se depositarán en frascos para cultivo de células Corning ® Flash de 50 mL. Los frascos se colocaron en una incubadora a una temperatura de 12±1 °C. En estas condiciones los nematodos pueden mantenerse viables alrededor de dos meses.

6.5 Bioensayos de patogenicidad

6.5.1 Cuantificación de juveniles infectivos (J3)

Para las cuantificaciones se tomaron 100 µL de J3 recién emergidos de larvas infectadas, se colocaron en una caja Petri, bajo un microscopio estereoscópico y se contó el número de nematodos presentes en la alícuota. Esto se repitió cinco veces para finalmente obtener un promedio de acuerdo a la fórmula siguiente (Woodring y Kaya, 1988):

A= D x C /B En donde:

A: Suspensión madre

B: Número de nematodos/mL de la suspensión madre

C: Volumen final en mililitros **D:**

Concentración obtenida

Se hicieron bioensayos de patogenicidad con concentraciones de 60 y 80 juveniles infectivos, se utilizaron cajas Petri de (60 x 15mm) con un fondo doble de papel filtro de abertura media, de 60mm de diámetro, donde se colocó una larva de *Tenebrio molitor* y se agregaron J3 vivos con 250 µL de agua destilada estéril.

Cada bioensayo estuvo formado por una unidad experimental de 15 larvas de *Tenebrio molitor*, con tres repeticiones. Se monitoreo la mortalidad a las 48, 72, 96 y 120 horas, considerando una larva muerta cuando presenta apariencia flácida y cambio en la coloración, además se verifico la presencia de nematodos con ayuda de un microscopio estereoscópico (Woodring y Kaya, 1988):

Con el porcentaje de mortalidad y considerando los aislados como tratamientos se realizó un análisis de varianza y una comparación múltiple de Tukey.

6.6 Bioensayos de virulencia

Para los bioensayos de virulencia se evaluaron concentraciones de 20,40, 60, 80 y 100 juveniles infectivos de cada uno de los aislados, siguiendo la misma metodología de los bioensayos de patogenicidad cada unidad experimental estuvo formada con 15 larvas de *Tenebrio molitor* con tres repeticiones. Así mismo, se estimó la CL50 considerando las concentraciones que obtuvieron mortalidades entre 10 y 80 %, con estos datos de mortalidad se realizó un análisis Probit con el programa Polo Plus.

6.7 Identificación Molecular

Para la extracción de DNA genómico (gDNA), se utilizaron 4000 nematodos en estadio juvenil infectivos (J3). Los nematodos se resuspendieron en 300 mL de NaCl 250 mM, EDTA 50mM, SDS 0.5 % y Tris 50 mM pH 8, después se agregó 20 µL de proteinasa K (Thermo Fisher Scientific) y se incubo a 55° C toda la noche, posteriormente las extracciones de fenol-cloroformo y la precipitación del DNA se realizó de acuerdo a Maniatis (1987). La integridad del gDNA se verificó mediante

electroforesis, mientras que la concentración y la pureza se determinaron espectrofotométricamente.

La región ITS del ADNr de los nematodos entomopatógenos aislados, se amplificó mediante PCR utilizando los cebadores TW81 y AB28, los cuales flanquean y amplifica la región ITS1-5.8S-ITS2 (Joyce et al., 1994). La mezcla de reacción consistió en lo siguiente: 2 µL de ADN genómico (40 ng/µL), 5,0 µL de tampón de PCR 10X, 6 µL de $MgCl_2$ (25 mM), 1,0 µL de mezcla de dNTP (10 mM de cada dNTP), 1 µL de cada cebador (10 pmol), 0,5 µL de ADN polimerasa Taq (5 U/µL; Thermo Fisher Scientific) y agua libre de nucleasas hasta completar un volumen final de 50 µL. Las condiciones de PCR consistieron en una etapa inicial de desnaturalización a 94 °C durante 5 min, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 s, alineamiento a 55 °C durante 40 s y extensión a 72 °C durante 1 min, con un ciclo final de extensión a 72 °C durante 10 min.

El producto amplificado de la región ITS1-5.8S-ITS2 tuvo un tamaño aproximado de 0,6 kb, la banda de DNA del gel de agarosa se cortó y purificó utilizando el kit Zymoclean DNA Recovery, siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, el producto de PCR se secuenció en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Las secuencias de DNA se analizaron y editaron utilizando el software BioEdit. Posteriormente, las secuencias se alinearon con las secuencias disponibles en GenBank mediante el programa bioinformático BLAST.

El árbol filogenético se construyó utilizando el método de unión de vecinos (neighbor-joining, NJ); las distancias genéticas se calcularon mediante el modelo de dos parámetros de Kimura, según lo implementado en el software MEGA 11. La topología del árbol se evaluó utilizando 1.000 réplicas de bootstrap. La secuencia de *Caenorhabditis elegans* AS, se utilizó como grupo externo.

6.8 Identificación morfométrica

6.8.1 Fijación de nematodos entomopatógenos para su identificación morfológica

Se utilizaron cajas Petri (60x15mm) con un disco de papel filtro Whatman del N° 1 humedecido con agua destilada estéril. Sobre el papel se colocó una larva de *Tenebrio mollitor*, y se agregó 1000 µL de la suspensión de J3 de la cepa aislada, una vez que la larva presentó signos de infección, esta se diseccionó para obtener machos y hembras de nematodos entomopatógenos.

Posteriormente, cada adulto se colocó en una caja Petri de vidrio con NaCl 0.75% y se agregó formol salino al 4% caliente, esto ayudó a que el nematodo quedará completamente extendido, lo que facilitó su observación en diferentes ángulos; posterior a esto se realizó el aclaramiento de los nematodos mediante evaporación gradual glicerina-agua destilada, en la proporción de 1:20, 1:15, 1:10, 1:5, 1:1 en una plancha de calentamiento (Caspeta, 2010).

Finalmente, la toma de medidas se llevó a cabo con la ayuda de un microscopio compuesto equipado con ocular micrométrico de acuerdo a lo propuesto por (Nguyen y Smart, 1996).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Nematodos entomopatógenos aislados de las parcelas de estudio

En la siguiente tabla se muestra los aislados de nematodos entomopatógenos representados con diferentes nomenclaturas, seguido del lugar en donde se aislaron y el hospedero. La cepa PCH9 se utilizó como control la cual fue aislada de un adulto de *S. acupunctatus*.

Tabla 2. Aislados de nematodos entomopatógenos.

Aislado	Lugar	Hospedero
TG1	Tepalcingo, Mor.	Larva de *G. mellonella*
T4	Tepalcingo, Mor.	Larva de *G. mellonella*
L1	Tepalcingo, Mor.	Larva de *S. acupunctatus*
L3	Tepalcingo, Mor.	Larva de *S. acupunctatus*
L5	Tepalcingo, Mor.	Larva de *S. acupunctatus*
CGM	Cuautla, Mor.	Larva de *G. mellonella*
PCH9	Cuautla, Mor.	Adulto de *S. acupunctatus*

Nota: los hospederos de *Galleria mellonella* son insectos cebos de donde se realizó el aislado de suelo, por otro lado las larvas de *S. acupunctatus* son larvas que se tomaron directamente de campo con signos de infección.

7.2 identificación molecular

Las secuencias de DNA de la región ITS1-5.8S-ITS2 de los nematodos entomopatógenos aislados en este trabajo, se depositaron en el GenBank, y se compararon con aquellas secuencias ya presentes en las bases de datos mediante BLAST, los resultados mostraron que, los seis aislados alinearon con el nematodo *Metarhabditis amsactae*; en donde los aislados de Tepalcingo, Mor. (LI, L3, L5, T4 y TG1) mostraron una identidad del 100 % con la cepa CJ6 (ID MT873043), mientras que el aislado de Cuautla, Mor. (CGM) presento una identidad del 99,86 % con la cepa ASR1 (ID OQ532995) y del 99,57 % con la cepa CJ6. Se construyó un árbol filogenético (Figura 9) utilizando las secuencias de ADN de la región

ITS1- 5.8S-ITS2 de los nematodos entomopatógenos aislados y secuencias obtenidas de GenBank (NCBI) que representaban tanto otras cepas de *Metarhabditis amsactae* como otras especies de nematodos. El árbol filogenético muestra que los nematodos aislados LI, L3, L5, T4, TG1 y CGM se agrupan con otras cepas de *Metarhabditis amsactae*; estos resultados sugieren que nuestros aislados corresponden a *Metarhabditis amsactae*. En México se han aislado nematodos del género *Metarhabditis*, como *Metarhabditis rainai*, pero es un nematodo necrómeno facultativo y se aisló junto con el entomopatógeno *Heterorhabditis kankabi* , pero no se ha identificado a *Metarhabditis amsactae*, por lo cual, este es el primer reporte del nematodo entomopatógeno *Metarhabditis amsactae* en México.

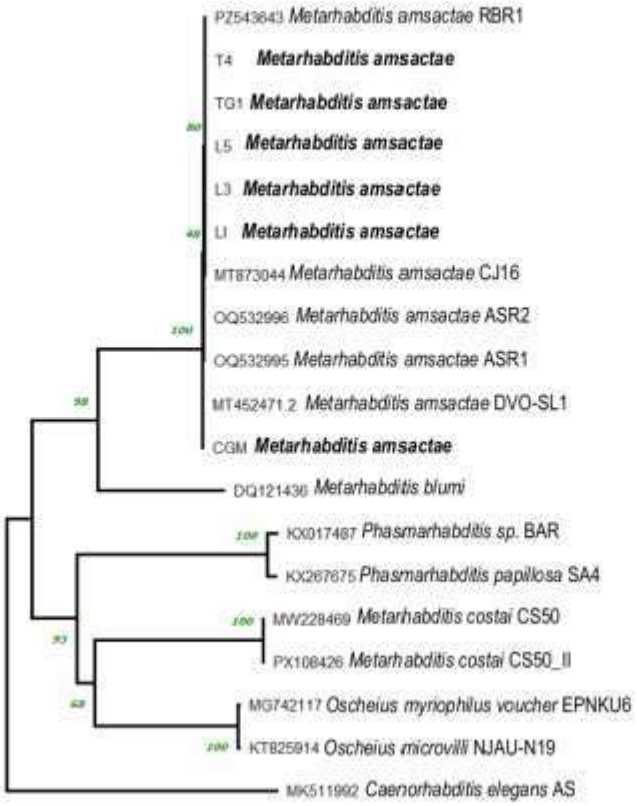


Figura 8. Árbol filogenético basado en la secuencia de DNA de la región ITS1 -5.8S-ITS2 de los nematodos aislados LI, L3, L5, T4, TG1 y CGM (en letras negritas) y secuencias de otras cepas de *Metarhabditis amsactae*, así como de otras especies de nematodos obtenidas de GenBank. Se incluyó *Caenorhabditis elegans* AS como grupo externo. El árbol se construyó utilizando el método de Neighbor-Joining.

Este nematodo entomopatógeno fue aislado por primera vez a partir de larvas de *Amsacta moori* (oruga de pelo rojo) recolectadas en Uttar Pradesh, India, y descrito por Ali *et al.,* (2011) bajo el nombre de *Oscheius amsactae.* Ese mismo año, Walter Sudhaus lo transfirió al género *Metarhabditis*. Los primeros aislamientos caracterizados molecularmente provinieron de suelos en India y Pakistán; en estos trabajos iniciales, Nguyen *et al.,* (2011) realizaron análisis filogenéticos de las regiones del ADNr (especialmente las subunidades 18S, 28S y la región ITS), demostrando la pertenencia de la especie a dicho género y formalizando su transferencia a *Metarhabditis amsactae*. Posteriormente, Bhat *et al.,* (2020) emplearon análisis filogenéticos mediante Inferencia Bayesiana y Máxima Verosimilitud, confirmando la relación de *M. amsactae* con *M. rainai* y *M. blumi*, además de resolver sinonimias en GenBank.

7.3 identificación morfológica

Juvenil infectivo: Cuerpo cilíndrico, vermiforme, translúcido y flexible en forma de "U". Presenta un extremo anterior redondeado y una cola posterior afilada que se estrecha en punta.

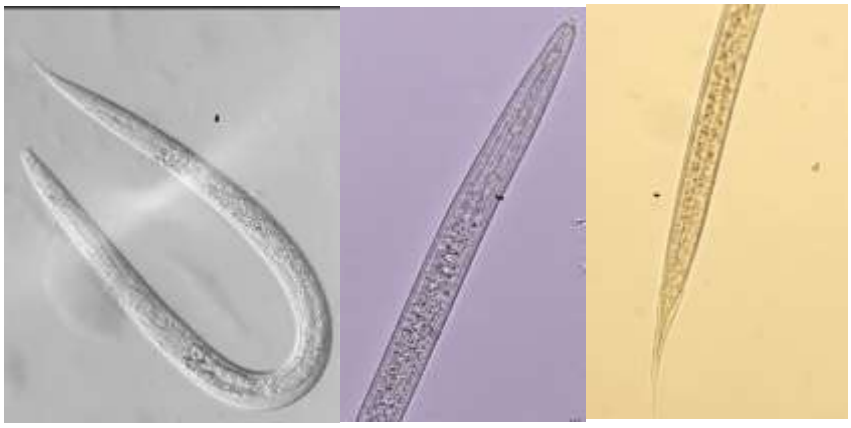


Figura 9. Características morfológicas de un juvenil infectivo de *Metarhabditis amsactae* bajo el microscopio óptico, donde a diferencia de un adulto aún no tiene definido sus órganos reproductores, el extremo anterior (cabeza) es romo/redondeada y posee una cola posterior que se estrecha gradualmente hasta terminar en una punta.

Machos: Labios redondeados agrupados en pares, posee metastegostoma provisto de dentículos setosos pequeños, faringe típica rabdítida con un metacorpus ligeramente ensanchado o fusiforme y un bulbo basal bien desarrollado. Presenta una cola cónica con un apéndice posterior filiforme, largo, robusto y muy desarrollado, bursa leptodera y abierta, que no cubre el extremo filiforme de la cola, presenta 8 pares de papilas genitales en la región caudal y espículas libres, con manubrium en gancho curvado ventralmente.

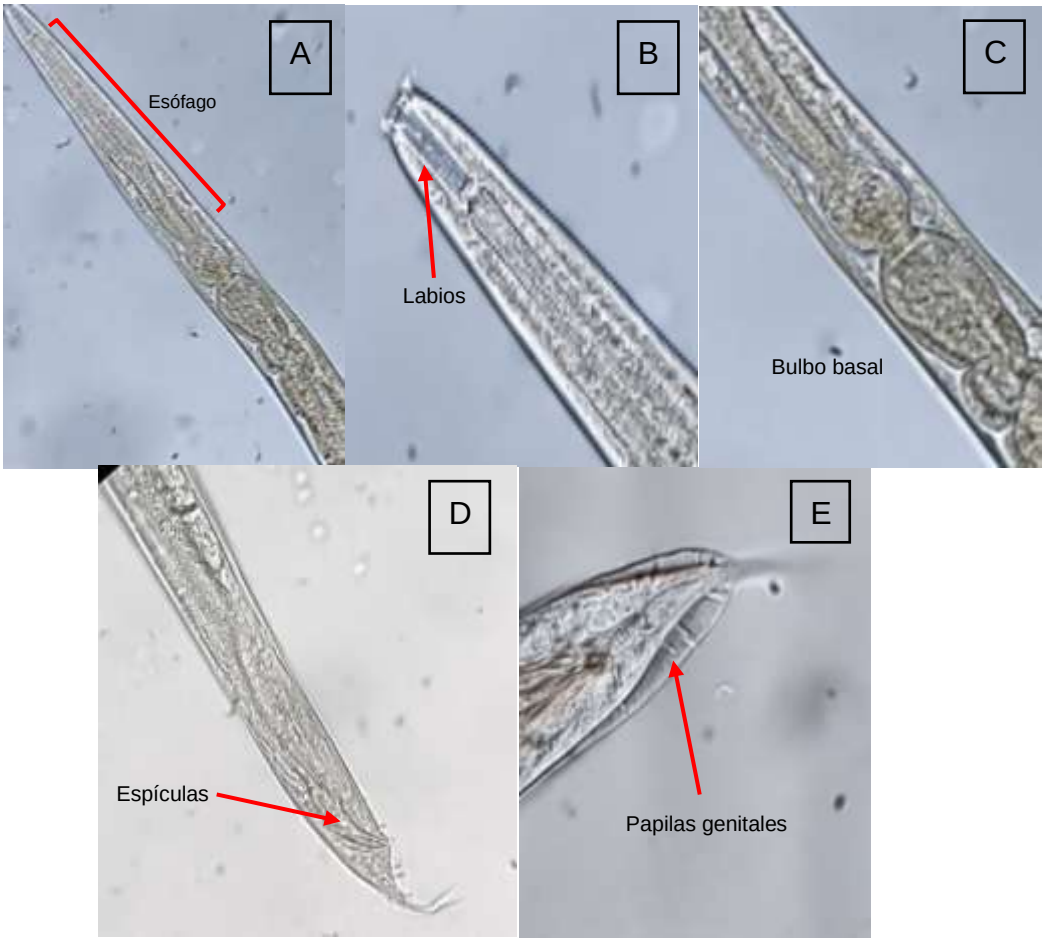


Figura 10. Características morfológicas de un adulto macho de *Metarhabditis amsactae* bajo el microscopio óptico. A) Vista general de la región anterior, donde se señala el esófago (delimitada en rojo) y la transición hacia los intestinos. B) Detalle de la región cefálica en el que se identifican los labios. C) Acercamiento de la porción posterior del esófago mostrando el bulbo basal. D) Región posterior/caudal que muestra las espículas. E) Detalle de la extremidad posterior con la localización de las papilas genitales.

Hembras: posee metastegostoma provisto de dentículos setosos pequeños, y son ligeramente más grandes que los machos, faringe típica rabdítida con un metacorpus ligeramente ensanchado o fusiforme y un bulbo basal bien desarrollado, vulva ubicada en posición casi ecuatorial (aproximadamente en la mitad del cuerpo) y presenta una cola en forma cónico-alargada con una punta aguda.



Figura 12. Características morfológicas de una hembra de *Metarhabditis amsactae* bajo el microscopio óptico. A) Región anterior: se aprecian los labios, el esófago, el bulbo basal y el anillo nervioso. B) Región media: se identifican el intestino y la presencia de un huevo. C) Región posterior: se señalan la vagina, el intestino, el ano y la cola.

De acuerdo a las características morfométricas de machos y hembras utilizadas para la identificación de nematodos, se observaron bajo microscopio compuesto 10 hembras y 10 machos de los 6 aislados y se realizaron mediciones morfométricas, de largo del cuerpo (L), ancho del cuepo (W), vulva de la hembra (V), espícula del macho (EP) y gubernáculum del macho (GU). Se calculó el valor promedio (µm) con las fórmulas que se muestran en la (tabla 3) y su desviación estándar (±) permitiendo la corroboración de la especie *Metarhabditis amsactae.*

Tabla 3. Morfometría de *Metarhabditis amsactae.*

CEPA	CARACTERES	HEMBRA	MACHO	J3

L1	N	10		
	L	923±82	788±40	386±56
	W (L/MBW)	17.9±2.4	16.3±1.9	16.4±1.9
	V (V/L*100)	49.8±1.9		
	EP		39±6.4	
	GU			
L3	L	923±82	18.9±3.4 787±40 16.3±1.9	384±56
	MBW (L/MBW)	17.9±2.4		16.4±1.9
	V (V/L*100)	49.2±1.8		
	EP		38±6.4	
	GU		18.9±3.4	
L5	L	923±82	788±40	385±56
	MBW (L/MBW)	17.9±2.4	16.3±1.9	16.4±1.9
	V (V/L*100)	49.8±1.9		
	EP		39±6.4	
	GU			
T4	L	923±82	18.9±3.4 788±40 16.3±1.9	386±54
	MBW (L/MBW)	17.9±2.4		16.4±1.9
	V (V/L*100)	49.8±1.9		
	EP		39±6.4	
	GU		18.9±3.4	
TG1	L	923±81	788±40	385±55
	MBW (L/MBW)	17.9±2.4	16.3±1.9	16.4±1.9
	V (V/L*100)	49.8±1.9		
	EP		39±6.4	
	GU			
CGM	L	921±81	18.9±3.4 788±42 16.4±1.9	385±55
	MBW (L/MBW)	17.6±2.4		16.4±1.9
	V (V/L*100)	48.3±1.8		
	EP		39±6.4	
	GU		18.9±3.4	

De acuerdo a estudios realizados por Ali *et al.* (2011) y Asif *et al.* (2013) en este estudio se obtuvieron medidas morfológicamente similares de *Metarhabditis*

amsactae, no muestrando diferencias importantes con las poblaciones descritas anteriormente, a diferencia de poblaciones descritas por Shaheen *et al.* (2011) Pervez *et al.* (2012) en la india de *Oscheius ciceri* y *Oscheius hussaini*, la variación en la morfometría puede atribuirse a diferencias en su origen geográfico. En la siguiente (tabla 4) se muestra las medidas morfométricas del estudio actual en comparación con los estudios antes mencionada, donde observamos que nuestros promedios seguidos de su desviación estándar, se encuentran dentro de los rangos de estudios anteriormente realizados.

Tabla 4. Comparación de rangos de morfometrías en machos de *Metarhabditis amsactae.*

MACHOS	L	W	EP	GU
Estudio actual	787± 40	16±4	38±40	18±38
(Ali *et al*., 2011)	594-804	16.6-19.3	34-39	16-28
(Asif et al., 2013)	638-868	18.1-21.7	33-39	14-20
(Bhat, *et al.,* 2020)	653-999	12.7-20.7	34-49	16-28
(Shaheen *et al*., 2011)	754-973	19.4-20.8	35-44	19-20
(Pervez *et al*., 2012)	673-821	18.3-24	24-27	9-10

Tabla 5. Comparación de rangos de morfometrías en hembras de *Metarhabditis amsactae.*

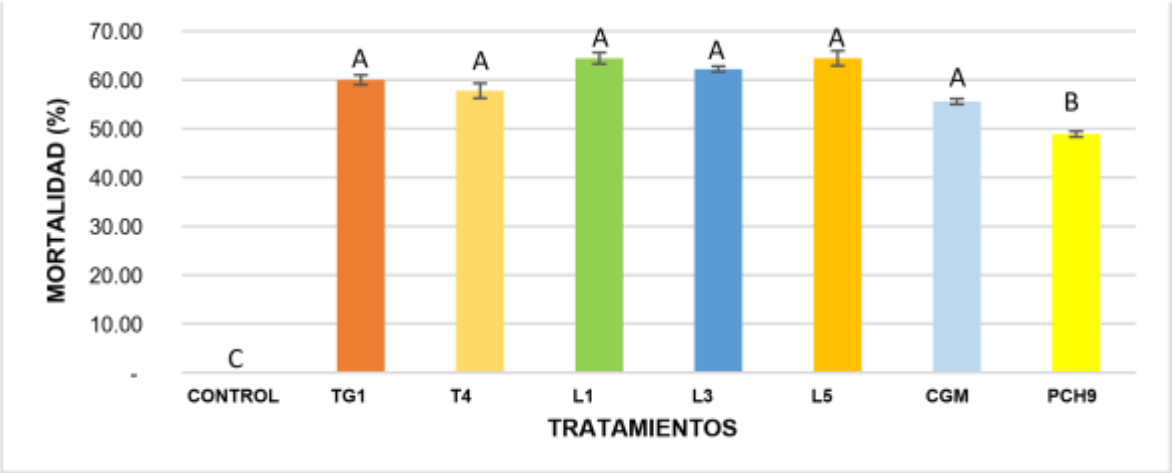
HEMBRAS	L	W	V
Estudio actual	922± 81	17±12	49±28
(Ali *et al*., 2011)	658-786	19.7-22.9	50-5
(Asif et al., 2013)	786-902	19.2-23.5	51-55
(Bhat, *et al.,* 2020)	718-1135	10.9-21.1	46-56
(Shaheen *et al*., 2011)	964-1018	20.1-22.5	48-59
(Pervez *et al*., 2012)	1418-1813	18.5-21.2	51-60

7.4 Bioensayos de patogenicidad

Para la concentración de 60 J3, se registraron mortalidades superiores al 40 %, en donde el aislado PCH9 presentó la menor patogenicidad (48.8 %), mientras que los aislados L5 y L1 alcanzaron el valor más alto (64.4 %). Por su parte, al incrementar la concentración a 80 J3, la mortalidad superó el 50 %; el aislado PCH9 se mantuvo como el de menor patogenicidad con un 57.7 %, en tanto que el aislado L5 registró la mayor efectividad con un 80 %. Los datos detallados de mortalidad para ambas concentraciones (60 y 80 J3) se presentan en las Tablas 6 y 7, así como en las Gráficas 1 y 2.

Tabla 6. Mortalidad de larvas *Tenebrio mollitor* con 60 J3. Se muestra su promedio y desv. estándar. Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey.

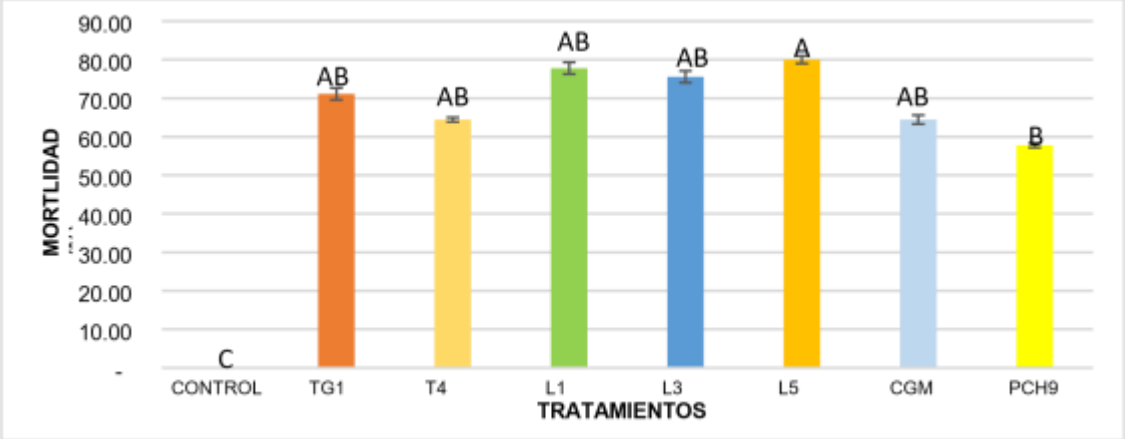
Tratamiento	Mortalidad ± DE	
TG1	60±1	A
T4	57.7±1.53	A
L1	64.4±1.15	A
L3	62.2±0.58	A
L5	64.4±1.53	A
CGM	55.5±0.58	A
PCH9	48.8±0.58	B



Grafica 1. En el eje X se representan los tratamientos correspondientes al grupo control y a los siete aislados evaluados (TG1, T4, L1, L3, L5, CGM y PCH9), mientras que en el eje Y se muestra el porcentaje de mortalidad acumulada en un intervalo de 0.00 % a 70.00 %. Las letras situadas sobre cada barra corresponden a la prueba de comparación de medias; letras distintas (A, B, C) indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

Tabla 7. Mortalidad de larvas *Tenebrio mollitor* con 80 J3. Se muestra su promedio y desv. estándar. Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey.

Tratamientos	Mortalidad ± DE	
TG1	71.1±1.53	AB
T4	64.4±0.58	AB
L1	77.7±1.53	AB
L3	75.5±1.53	AB
L5	80±1.0	A
CGM2	64.4±1.15	AB
PCH9	57.7±0.58	B



Grafica 2. En el eje X se representan los tratamientos correspondientes al grupo control y a los siete aislados evaluados (TG1, T4, L1, L3, L5, CGM y PCH9), mientras que en el eje Y se muestra el porcentaje de mortalidad acumulada en un intervalo de 0.00 % a 90.00 %. Las letras situadas sobre cada barra corresponden a la prueba de comparación de medias; letras distintas

(A, B, C) indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

7.3 Bioensayos de virulencia

De acuerdo con los valores de Concentración Letal Media CL50, el aislado L5 presentó la mayor patogenicidad al registrar la CL50 más baja con 27 J3/larva (límites al 95 %: 17.56 – 35.8), seguido estrechamente por L1 con 28 J3/larva y L3 con 30 J3/larva. Por el contrario, el aislado PCH9 demostró la menor virulencia al requerir CL50 más elevada (47 J3/larva; límites al 95 %: 32.8 – 65.1), seguido por CGM con 40 J3/larva.

Tabla 8. CL50 sobre larvas de *Tenebrio mollito*r de los aislados de NEP con el análisis Probit, con sus respectivos intervalos de confianza.

TRATAMIENTO	CL50 (J3/larva)	LIMITE 0.95	
		INFERIOR	SUPERIOR
L5	27	17.56	35.8
L1	28	18.5	36.5
L3	30	17.7	39.6
TG1	32	22	41.2
T4	34	20.3	45.5
CGM	40	28.8	51
PCH9	47	32.8	65.1

De acuerdo con Grewal et al., (2005), aunque los nematodos entomopatógenos pertenezcan a la misma especie, las tasas de mortalidad que inducen en las larvas pueden variar sustancialmente debido a factores del nematodo como sus bacterias simbiontes, el hospedador y el entorno del bioensayo. Por ejemplo, las poblaciones de una misma especie recolectadas en distintas regiones geográficas presentan diversidad genotípica, lo que altera su virulencia, capacidad de búsqueda y adaptabilidad ambiental. Así mismo, la carga bacteriana constituye un factor determinante, ya que no todos los juveniles infectivos (J3) transportan la misma

cantidad de bacterias en su tracto digestivo; aquellos con una mayor carga inducen la septicemia con mayor rapidez. De igual forma, se ha documentado que ciertos aislados intraspecíficos logran penetrar en mayor número a través de las aberturas naturales de la larva (boca, ano y espiráculos) durante las primeras horas de exposición (Grewal et al., 2005). Aunado a la carga bacteriana o la edad, los aislados difieren significativamente en su virulencia debido a una capacidad diferencial para secretar proteínas efectoras e inhibidores inmunológicos que neutralizan las defensas del hospedador inmediatamente después de la infección (Toubarro et al., 2013).

8. CONCLUSIÓNES

1. Se aislaron exitosamente dos cepas de nematodos entomopatógenos en el estado de Morelos.
2. Los aislados que presentaron los niveles más altos de virulencia fueron aquellos obtenidos directamente a partir de larvas infectadas de *Scyphophorus acupunctatus.*
3. Mediante la integración de caracterizaciones morfométricas y moleculares, se determinó una identidad del 100% de los aislados con *Metarhabditis amsactae,* constituyendo este trabajo el primer reporte documentado de dicha especie en México.

9. BIBLIOGRAFIA

Akhurst, R. (1982). Antibiotic activity of *Xenorhabdus spp.,* bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes of the families Heterorhabditidae and Steinernematidae. *Journal of General Microbiology,* 128, 3061–3065.

Almazán, G., Armendáriz, G., Rodríguez, S. (2004). Estudios preliminares con nematodos entomopatógenos para el control biológico de la mosca del cuerno, *Haematobia irritans L*. (Diptera: Muscidae). Veterinaria México.

Aquino, B., Ruíz, J., Iparraguirre, M. (2006). Manejo Integrado de *S. interstitialis* con nematodos y hongos entomopatógenos, en agave mezcalero. *Revista UDO Agrícola*, *6*(1), 92-101.

Arroyo, P., Solano, E., García, A. (2010). Reevaluación del riesgo de extinción de cinco especies del género *Polianthes L*. (Agavaceae). Acta Botanica mexicana 92: 11-28.

Ali, S. S., Pervez, R., Andrabi, R., Sharma, R., & Verma, V. (2011). *Oscheius amsactae* n. sp. (Nematoda: Rhabditida), a necromenic associate of red hairy caterpillar, *Amsacta moori* (Lepidoptera: Arctiidae) from Kanpur, India. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 44(9), 871–881.

Boemare, N. (2002). Biology, taxonomy and systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus.* In Entomopathogenic nematology (CAB Intern).

Bharti, H., Singh K., Singh R., Kumar R., Singh M. (2016). Genetic diver- sity and relationship study of single and double petal tuberose (*Polianthes tuberosa* L.) cultivars base on RAPD and ISSR markers. Indian *Journal of Horticulture* 73(2): 238244.

Bhat, A. H., Srivastava, S., Rana, A., Chaubey, A. K., Machado, R. A., & Abolafia, J. (2020). Caracterización morfológica, morfométrica y molecular de *Metarhabditis amsactae* (Ali *et al,.*2011), (Sudhaus, 2011) (Rhabditida, Rhabditidae) de la India y

propuesta de *Metarhabditis longicaudata* como sinónimo menor de *M. amsactae*. *Journal of Nematology*, *52*(1), 1-23.

Bruno, P., Machado, R., Glauser, G., Köhler, A., Campos, R., Bernal, J., Turlings, C. (2020). Entomopathogenic nematodes from México that can overcome the resistance mechanisms of the western corn rootworm. Scientific reports, 10(1), 1-12.

Campbell, J. y Gaugler, R. (1993). Nictation Behaviour and Its Ecological Implications in the Host Search Strategies of Entomopathogenic Nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae). 126(3/4), 155– 169.

Camino, L., Castejón, G., Figueroa, B., Aldana, L., Valdés, E. (2002). *Scyphophorus acupunctatus* (Coleoptera: Curculionidae) atacking *Polianthes tuberosa* (Liliales: Agavaceae) in Morelos, México. Florida Entomol. 85: 392-393.

Caspeta, J. (2010). Nematodos parásitos de peces de agua dulce de México. Facultad de Ciencias Biológicas, Centro de Investigaciones Biológicas. Universidad Autónoma Del Estado de Morelos. ISBN: 978-607-7551-24- 9.

Castro, R. (2015). Nematodos entomopatógenos en cultivos de caña de azúcar del estado de Morelos. Tesis para obtener el grado de maestro en biotecnología. 74 Universidad Autónoma del Estado De Morelos. Centro de Investigaciones en Biotecnología.

Castro, I., Caspeta, J., Suarez, R., Peña, G., Ramirez, J., Cruz, K., Arenas, I., Hernandez, V. (2020). *Oscheius myriophila* (Nematoda: Rhabditida) isolated in sugar cane soils in Mexico with potential to be used as entomopathogenic nematode. *Journal of Nematology,* 52(1), 1–8.

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

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

De Ley, P. y Blaxter, M.L. (2002). Systematic position and phylogeny. In: Lee, D.L. (Ed.). The biology of nematodes.Londonnematodes. London, UK, Taylor & Francis, pp. 1-30.

Dole, J. y Wilkins, H. (2005). Floriculture. Principles and species. Pearson Prentice Hall. USA. 1023 p.

Delgado, J., Ruíz, J., Ibarra, T. y Giron, S. (2015). Isolation and Identification of Native Entomopathogenic Nematodes (Nematoda: Rhabditidae) and Potential for Controlling *Scyphophorus acupunctatus* in a Laboratory. Southwestern Entomologist, 40(4), 731-739.

Domínguez, M. (2022). Aislamiento e identificación de nematodos entomopatógenos en suelos de cultivos de importancia económica en el municipio de Ayala, Morelos, México. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Gaugler, R. y Kaya, H. (1990). Entomopathogenic nematodes in *biological control* CRC Press, Boca Raton, pp: 365.

Grewal, P. y Georgis, R. (1999). Entomopathogenic nematodes. In Biopesticides: use and delivery (pp. 271-299). Humana Press.

Grewal, P. (2000). Mushroom pest. In: Lacely and H. K. Kaya, eds. Field Manual of techniques in vertebrate pathology. L. A. Dordrecht, The Netherlands, Klower Academic publishers. 497-503.

Grewal, P. S., Ehlers, R.-U., & Shapiro-Ilan, D. I. (2005). *Nematodes as Biocontrol Agents*. CABI Publishing. *(Fundamento teórico sobre la variabilidad genética, estrategias de búsqueda y adaptabilidad de distintos aislados geo-genéticos.*

Grifaldo, P. (2011). Incidencia de nematodos entomopatógenos en áreas cañeras de Veracruz y su interacción con el barrenador de la caña de azúcar *Diatraea saccharalis*. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Edo. De México.

Girón, P., Ruiz, V., Pérez, P., Sánchez, G., Aquino, B. (2012). Isolation of entomopathogenic nematodes and control of Phyllophaga vetula Horn in Oaxaca, México. *African Journal of Biotechnology*.

González, R., Rodríguez, J., Castañeda, M., Rodríguez, A., Van, J., Tapia, E. (2012). Mexican geophytes I. The genus *Polianthes.* Floriculture and Ornamental Biotechnology. 6:122-128.

Grifaldo, P., Alatorre, R., Segura, O., Hernandez, F. (2017). *Steinernema ralatorein sp.* 1 Isolated from Sugarcane Areas at Veracruz, México. Southwestern Entomologist, 42(1), 171-190.

Grifaldo, F., Alatorre, R., Villanueva, J., Hernández, F., Stock, S., Ramírez, G. (2019). Evaluación de dos cepas de nematodos entomopatógenos (Steinernematidae, Heterorhabditidae) para el control del salivazo (Hemiptera: Cercopidae) en caña de azúcar. Nematropica, 49(1), 83-90.

Hernández, R., Gutiérrez, O., Aldan, L., Valdés, E. (2006). Fecundity of the Sisal Weevil, *Scyphophorus acupunctatus* (Coleoptera: Curculionidae), on *Polianthes tuberosa* (Liliales: Agavaceae). Florida entomologist. 89(4): 518-520. HuertaAlcocer, S.A., L

Hassanpour, A., Roein, Z., Abbasi, J. (2011). Response of tuberose (*Polianthes tuberose L*) to gibberelic acid and benzyladenine. Hortic. Environ. Biotechnol. 52:4651.

Islas, G., Torres, B., Gijón, A. (2021). Identificación de nematodos entomopatógenos con potencial para el manejo de *Dendroctonus frontalis* (Curculionidae: Scolytinae). Interciencia, 46(7/8), 296-301.

Joyce, S., Reid, A., Driver, F., Curran, J. (1994). Application of polymerase chain reaction (PCR) methods to identification of entomopathogenic nematodes. In: Burnell, A.M., Ehlers, R.U., Masson, J.P. (Eds.). Biotechnology: Genetics of Entomopathogenic Nematode Bacteria Complexes, DG XII, Luxembourg, European Commission, 178-187.

Kaya H. y Hara A. (1981). Susceptibility of various species of lepidopterous pupae to the entomogeneous nematode Neoaplectana carpocapsae. *Journal of Nematology.* 13 (13), 91-294.

Kaya, H. y Stock, S. (1997). Techniques in insect nematology. Manual of techniques in insect pathology. Lawrence Lacey. Eds. Academic Press, Inc. San Diego, 281324.

Koppenhofer, M., y Fuzy, E. (2006). Effect of soil type on infectivity and persistance of the entomopathogenic nematodes *Steinernema scarabai, Steinernema glaseri, Heterorhabditis zealandica* and *Heterorhabditis bacteriophora*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 92(1), 11–22.

Leyva, H., García, C., Ruíz, J., Calderón, C., Luna, A., García, S. (2018). Evaluación de la Virulencia de *Steinernema riobrave* y *Rhabditis blumi* contra Larvas del Tercer Instar de *Spodoptera frugiperda. Southwestern Entomologist,* 43(1), 189197.

Molina, J., Nguyen, K., González, M., Quintana, G., Lezama R., Foster, E. (2009). *Steinernema diaprepesi* (Nematoda: Steinernematidae): its occurrence in western México and susceptibility of engorded cattle ticks Boophilus microplus (Acari: Ixodidae). Florida Entomologist, 92(4), 661663.

Muriithi, A., Wamocho, L., Njoroge, J. (2011). Distribution, production and quality characteristics of tuberose (*Polianthes tubererosa L*.) cut flower in Kenya. Afric. J. Hortic. Sci. 5:26-35.

Montoya, E. (2012). Caracterización de nematodos entomopatógenos aislados del Valle de Guasave, Sinaloa, México.

Montores, J., Cortez, H. y Zepeda, I. (2016). Presencia de nematodos entomopatógenos *Steinernema Travassos* y *Heterorhabditis sp* en La Ciénega de Chapala, Michoacán, México. Entomología Mexicana, 3, 262268.

Nguyen, K. y Smart Jr, G. (1996). Identification of Entomopathogenic Nematodes in the Steinernematidae and Heterorhabditidae (Nemata: Rhabditida). *Journal of Nematology,* 28(3), 286-300.

Navone, G., Achinelly, M., Notarnicola, J., Zonta, M. (2017). Phylum Nematoda.
Poinar, G. (1979). Nematodes for biological control of insects. CRC Press, Boca Raton, FL.

Poinar Jr, G., Thomas, G., Haygood, M., Nealson, K. (1980). Growth and luminescence of the symbolic bacteria associated with the terrestrial nematode, *Heterorhabditis bacteriophora*. *Soil Biology and Biochemistry,* 12(1), 5–10.

Poinar, G. (1989). Non-insect host for the entomogenous rhabditide nematodes Neoaplectana (Steinernematidae) and Heterorhabditis Heterorhabditidae). Revue de Nématologie, California, USA. 12, 423428.

Poinar Jr, G. (1993). Origins and phylogenetic relationships of the entomophilic rhabditids, Heterorhabditis and Steinernema. Fundamental and Applied Nematology, 16(4), 333– 338.

Poinar Jr, G. (2011). The Evolutionary History of nematodes. Brill, Leiden, 439 pp.

Ruiz, J., Aquino, T., Kaya, H., Stock, P. (2003). Colecta y evaluación de nematodos entomopatógenos para el control de gallinas ciegas *Phyllophaga vetula* (Horn) en Oaxaca, México. Folia Entomol. Mex. 42: 169-175.

Stock, P., Pryor, B., Kaya. (1999). Distribution of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) in natural habitats in California, USA. Biodiversity and Conservation 8:535–49.

Sturhan, D., Spiridonov, S., Mracek, Z. (2005). Steinernema silvaticum sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopatogenic nematode from Europe.Nematology 7: 227- 241.

Stock, S., Rivera, B., Flores, L. (2009). *Heterorhabditis sonorensis sp.* (Nematoda: Heterorhabditidae), a natural pathogen of the seasonal cicada Diceroproctaornea (Walker) (Homoptera: Cicadidae) in the Sonoran Desert. *Journal of Invertebrate Pathology.*

Sudhaus, W. (2011). Phylogenetic systematisation and catalogue of paraphyletic Rhabditidae (Secernentea, Nematoda). *Journal of Nematode Morphology and Systematics*, 14(2), 113–178.

SIAP, (2014). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Ciclo agrícola 2014.

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

Salgado, R., Rivera, N., Martínez-, F., Beltrán, L., Hernández, A., Dantán, E. (2017). Draft genome sequence of *Photorhabdus luminescens* HIM3 isolated from an entomopathogenic nematode in agricultural soils.

Genome announcements, 5(35).

Sotelo, F., Alatorre, R., López, V., Villegas, E., Carrillo, M. y Mayorga, L. (2017). Natural Occurrence of Heterorhabditis indica Poinar, Karunakar & David1 on Sugarcane Weevil, *Sphenophoru incurrens Gyllenhall*, at Morelos, México. *Southwestern Entomologist, 4*2(3), 905-910.

Toubarro, D., Ávila, M. M., Montiel, R., & Simões, N. (2013). *A serine protease secreted by the entomopathogenic nematode Steinernema carpocapsae clears the host immune response*. *BMC Microbiology*, 13, 241.

Vashisth, S., Chandel, Y., Sharma, P. (2013). Entomopathogenic nematodes areview. *Agricultural Reviews*, 34(3).

Villanueva, E., Ramírez, S., Villanueva, C., Herbert, E. (2019). Nematodos entomopatógenos nativos en el cultivo de nopal verdura en milpa alta, México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, *25*(3), 1-9.

Villanueva, E., Guzmán, A., Lomelí, J., Alatorre, R., Ortíz, C., Manuel, V. (2017). Susceptibility of Bradysia difformis 1 to Entomopathogenic Nematodes and their Persistence in Substrates Used for Poinsettia Production. Southwestern Entomologist, 42(4), 1015-1026.

White, G. (1927). A method for obtaining infective nematode larvae from vultures. Science 66 pp: 302-303gg.

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

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

Maestría en Biotecnología

Cuernavaca, Morelos, a 22 de octubre del 2026.

VOTOS APROBATORIOS DE TESIS

Los integrantes de la Comisión Revisora de la tesis titulada: AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS SOBRE *Scyphophorus acupunctatus* EN CULTIVOS DE NARDO EN EL ESTADO DE MORELOS. Que presenta la **C. Thania Gisel Rodríguez Ocampo**, del Programa de Posgrado Maestría en Biotecnología, bajo la dirección del Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez y la codirección del Dr. Renato León Rodríguez han determinado que el documento reúne los requisitos académicos para su defensa oral en el examen de grado, por lo que emiten su **VOTO APROBATORIO.**

Comisión Revisora de tesis (firma electrónica)

Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez (director de tesis, CEIB-UAEM)

Dr. Renato León Rodríguez (codirector de tesis, IB-UNAM)

Dra. Susana Valencia Díaz (CEIB-UAEM)

Dr. Guadalupe Peña Chora (CIB-UAEM) Dr.

Erubiel Toledo Hernández (UAGro)

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

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

Sello electrónico

VICTOR MANUEL HERNANDEZ VELAZQUEZ | Fecha:2026-10-23 08:24:20 | FIRMANTE

qoTxver8ja+CzTjOqyblwukH1Rh5FKprqGePCGx/HEs8y3IQRWexG9REaS+BA7dw2TW80GvThjzsDOH6/8VthWyJThlbdyw8J72evUdRuKFwaERK5nKXHj/+tSQGa9G+j3aQud+SzeW1vntbLp0g2riCuALG5hDGtqB/gcAmxKwxTnzVhtLsoVihHUb+eKZW5Mt6FjwXxzMh3sUF+7A4DMWPOBQ9LHQWIyMjW7GFAFnwpyhRatrM20eTwvdC28OHoDM+dd4HAcR7aDjGzFm/u29nobL/opjh4PWfu/xAwgz+hK7gbcTmAVOiPM9f91TSjZWTuBl+RJBEtU7oHpdg2Q==

SUSANA VALENCIA DIAZ | Fecha:2026-10-23 08:28:52 | FIRMANTE

ngg4ISuDQfqSS108lAW3wQ/77NoNNHX+TN/grasQ45RK2BwPZ/Jto0hykJCJ74g1y0EOhTJyYsy2Ps6LuhDbxZgEIkp9nPs93JaIOhvpjxS1+pV+gq0ka39d+YfEMtCmstZLE553RBGRMlG7ikudSR54OwAEumoMfee88J3GRMbJC9H2Ubkx7pVds98Avuh09wbXWgBGIzeaXxY0fbsmimYfBp1gU4JCgMgfmtNlkkBguUBkfTTr/jrmCjaw7/B5rvBIMe8thS9jz+WMW3K2XRTcHVJ73Z+zRtAiHoYusUVSBzYehpMB5vadP7zJlk7oUjsMt75+OTJhDRKuPTmWgg==

GUADALUPE PEÑA CHORA | Fecha:2026-10-23 09:37:39 | FIRMANTE

WteAAftydV2ucZXMVela8xnVJclvfSA0PPdtcyazM5TaWul5YYVcBwTjfir20ryiFZdUwYjAqlKEm629vBdSG/hlDJCD4kxxEdrTyDtyrMtmNy0IvozHRuIKXI2mZVy29gztlh2D6vqrCcEDkt5vGFnBIWHhX5Ma2hCQNE0MtqBvAZmnunIJv0GylKiKUqRKigWjoQjpTq/KoKNloZLlqb8LKHAPoBLT6RJHyB9HqCCMesFI4rXHQ62rbITS0oAQSGwoCpPdOOSIUNc5cWMGLXOIpJNUuuW0MkKPptyH46kM/Sa6O+9gykOWKkopgl4W1TF2U60od6N0KvdaAiLVbQ==

RENATO LEÓN RODRÍGUEZ | Fecha:2026-10-24 15:04:07 | FIRMANTE

bopL+W66vPz7SKwZc/0i6vbFkxkbV4cYZkvqp0dyXjESkdFv+cGZqT5Qv+iISrjhU8BlYbQzseuVvZXWJAy+FALM2bso3G9BQh23haIfD4qkE9LmkG+F1hh6RbrodJ52yd3v5PKJeH4PsIAiMQr77mH47tgdFXqDAIy+wHT38t4E9sCG6gAIc6J28furCi+hHgP+i++/QD6CrgxxeQ6x3kellUbwl8zDdnA7oOlHvtgIkrLi/BAcRgxd9AZ8FmFPl1xsviX/VtBdBakOPdniuFEuGo8TrWbDiWN5rpi9yZ4b0wAwV16ffOhYaRtFiF0u/TXmTmU7NeHsvO+nvhldMQ==

ERUBIEL TOLEDO HERNÁNDEZ | Fecha:2026-10-24 16:45:31 | FIRMANTE

zaJZXXsi563cKEmolsbYWOez1t2q80N8DytDnwTkrEKgVs2lDWk9wf111bdOUM9Gy2PwEgN4eYRUFstV9b6ABcRus4YlU6TY9AwioHlcVUTfEVaf3qJ8QN3HDwJgT3HJuGrRe1Dx6aflcZXCHORQ/UnXX3HhJ1AkjO4GVRhgvqNsyVeKPppyXluZ1GwwpieFSXqSNgxiIO+xDo0ExOStm3uSWwOhU0dcbt3DIlkYk23z1exxBbDYbor55pknyC1hxo95+iYoxWNbNH0m0NWVlokaz9VzZdTnBzM/PPv4wp+X+XSIskM9707HkGgJBYactrVoZw5PpYLbdgaUrA96JA==

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

NOBpuV7GL

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/JfliFa0Nge15uI16Fu6TYDXmoxLuhl7y