

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

## Doctorado en Ciencias Naturales

### Centro de Investigación En Biotecnología

**Aislamiento, identificación y evaluación de tres cepas de  
nemátodos entomopatógenos en cultivos de caña de azúcar en  
Morelos.**

**T E S I S  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS NATURALES**

**P R E S E N T A:  
IVETH DEL ROCIO CASTRO ORTEGA**

**DIRECTOR: DR. VÍCTOR MANUEL HERNÁNDEZ VELÁZQUEZ  
CO-DIRECTOR: DR. JUAN MANUEL CASPETA MANDUJANO**

**Cuernavaca, Morelos**

**Febrero , 2020**

**Aislamiento, identificación y evaluación de tres cepas de nemátodos entomopatógenos en cultivos de caña de azúcar en Morelos.**

Tesis realizada por la M.B. Iveth del Rocio Castro Ortega bajo la dirección del Comité Revisor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS NATURALES**

**COMITÉ REVISOR**

Director de tesis: Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez

Co-Director: Dr. Juan Manuel Caspeta Mandujano

Revisor: Dr. Ramón Suarez Rodríguez

Revisor: Dr. Guadalupe Peña Chora

Revisor: Dr José Augusto Ramírez Trujillo

Revisor Alfredo Jiménez Pérez

Revisor Víctor López Martínez

## **DEDICATORIAS**

### **A Dios**

Por colmar de bendiciones mi camino y llenar mi vida de gracia y paz" aun en los momentos más difíciles. Sé que me amas, que siempre estas, estuviste y estarás conmigo y yo en ti, más allá del tiempo y el espacio. AMEN

### **A Fátima Yaretzi**

Mi más grande amor y fuente de inspiración, quien llena mi vida de luz y me motiva a levantarme y seguir luchando por un mundo mejor. Te amo infinitamente hija mía.

### **A Hugo Colín Caballero**

Por ser mi compañero de vida y apoyarme en mis proyectos con paciencia amor y entrega IDEM.

### **A mis padres Feliciano Castro Estrada y Rocio Ortega Bernal**

Cuando pienso en honor, entrega, amor y lucha recuerdo su ejemplo, las vivencias en familia, la recilencia de ambos por salir a delante de cualquier situación. Gracias por su apoyo y por no permitirme rendirme ante nada ni nadio. "Lo imposible cuesta solo un poco más" todo lo que soy lo debo a ustedes los amo hasta la eternidad.

### **A mis hermanos**

Mis protectores y amigos Mario Alberto, Cesar Omar y Roberto con quien he compartido mi vida y he pasado los momentos más divertidos y gloriosos en su compañía, donde cada uno de ustedes me ha mostrado su fuerza, coraje, alegría por la vida, responsabilidad y cariño sin duda ustedes han sido de gran influencia

### **A mis sobrinos**

Angélica, Andrea, Arina, Omar, Mateo, Saori por ser los angeles que me hacen saber lo grande que es el amor, con quienes juego, peleo, aconsejo y sobre todo me divierto, los amo a todos de una manera única y especial a cada uno de ustedes.

### **A mis amigos**

La familia que se escoge por estar presentes en mi corazón, mente y oraciones, Anie, Alicia, Alejandra, Edgar, Silvia, Said, Mare. Los amo

Hazme un instrumento de tu paz  
donde haya odio lleve yo tu amor  
donde haya injuria tu perdón señor  
donde haya duda fe en ti

Maestro ayúdame a nunca buscar  
el ser consolado sino consolar  
ser entendido sino entender  
ser amado sino yo amar

Hazme un instrumento de tu paz  
que lleve tu esperanza por doquier  
donde haya oscuridad lleve tu luz  
donde haya pena tu gozo señor

Maestro ayúdame a nunca buscar  
el ser consolado sino consolar  
ser entendido sino entender  
ser amado sino yo amar

Hazme un instrumento de tu paz  
es perdonando que nos das perdón  
es dando a todos como tu nos das  
muriendo es que volvemos a nacer

Maestro ayúdame a nunca buscar  
el ser consolado sino consolar  
ser entendido sino entender  
ser amado sino yo amar

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez, por su dirección, apoyo y paciencia en la realización de este trabajo. Por sus enseñanzas y transmitirnos la alegría por la vida, la familia y el trabajo. Nunca lo vi enojado pese a que no faltaban motivos, un ejemplo de templanza, paciencia y solidaridad. Gracias infinitas, mi estima, respeto y admiración

Al Dr. Juan Manuel Caspeta Mandujano por su dirección apoyo y paciencia en la realización de este trabajo, por todas sus enseñanzas. Siempre infundiendo constancia y rectitud en busca de la perfección en el trabajo, sin excusa alguna, mi respeto y admiración. Gracias

Al Dr. Guadalupe Peña Chora por su apoyo y dedicación en este camino, por enseñarme el amor al campo y la investigación, por ser un tutor más desde el servicio social. Por su fraternidad y humildad en todo momento, gracias por sus consejos y apoyo, las mañanas del café y las salidas a campo son momentos que atesorare por siempre, los momentos de reflexión, planificación y relajación, donde escucharlo reír nos invitaba a comenzar bien el día, mi estima, respeto y admiración. Gracias

Al Dr. Ramón Suarez Rodríguez por su apoyo y paciencia en la realización de este trabajo, por todas sus acertadas aportaciones, por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio

Al Dr. José Augusto Ramírez por su apoyo y ayuda en la realización de este trabajo y por sus valiosas aportaciones. Por sus paciencia y dedicacion.

A MI GRAN AMIGO Y ANGEL Edgar Sánchez, por enseñarme el amor a la nematología, por ser un maestro y guía, por enseñarme a no rendirme y buscar mis sueños por tu valiosa amistad, un día nos volveremos a ver mi querido amigo.

A la M. en C. Alicia Fonseca González por su apoyo incondicional y acertadas aportaciones. Gracias amiga querida por todos los momentos que compartimos, por consolarme y reír conmigo. Eres una mujer inteligente, fuerte y tenaz.

A la Dr. Alejandra Buenosaires por su apoyo incondicional, por los consejos y momentos compartidos, por la hermosa amistad que se ha convertido en hermandad.

A la M en C Silvia Ramírez por sus enseñanzas y aportaciones en la realización de este proyecto, por su cariño y amistad incondicional, por formar parte de mi familia y ser un ejemplo en mi vida. mi respeto y admiración.

Al M en C Said por sus enseñanzas y aportaciones en este camino, un investigador crítico, constante, inteligente y perfeccionista, con la humildad para compartir sus conocimientos. Mi respeto y cariño e infinita gratitud.

A la Dr. Verónica Obregón por sus sabios consejos y sinceridad, por el apoyo en la realización de este proyecto, al proporcionar material biológico. Pero sobre todo por su valiosa amistad , mi cariño, respeto y admiración

A la M en C. Adriana Trejo por invitarme a crecer en todos los aspectos de mi vida, por su cariño y sinceridad en cada consejo, por la bella amistad que me brindo. Mi respeto y admiración.

A la M en B. Marel Avila por su valiosa amistad por su apoyo en la realizacion deeste proyecto, por su ayuda incondicional y sin reserva. Gracias por todo, mi respeto y admiración.

A la Biol. Fernanda Cristina Barrera Garduño por su apoyo, paciencia y asesoría. Por la valiosa labor que realiza en el CEIB, por estar pendiente de cada alumno, con una capacidad laboral inigualable. Mi respeto y admiración.

A la. M en C. Laura Lina por su apoyo y valiosas aportaciones. Por estar pendiente de nuestras necesidades, por proporcionar material biológico para la realización de este y todos los proyecto. Gracias

Al Ing. Mario Sierra por permitirnos llevar a cabo los trabajos de investigación en su parcela..

A mis amigos y compañeros con quienes es un verdadero placer contar: Karina, Marel, Aridai, Edwin, Julio,Victor, Tali, Calep, Hector, Ofelia, Eva, Adriana Trejo, Elenita Hidalgo, Rosi, Rous, Karla Murillo, Verónica Obregón, Eli, Mariel. Silvia, Said, Marina, Rosi Ortiz, Haylle, Adriana, Diego a todos ustedes mi gratitud y cariño

Al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y a la Universidad Autónoma del estado de Morelos por su apoyo y patrocinio para la realización de este proyecto de tesis

.

## Índice

<b>Resumen</b>	1
<b>Summary</b>	2
<b>I. Introducción</b>	3
<b>II. Antecedentes</b>	4
2.1 Nemátodos entomopatógenos	4
2.1.2 Definición de nemátodo entomopatógeno	4
2.1.3 Asociación nemátodo-bacteria	5
2.1.4 Variación de fase de las bacterias simbióticas	5
2.1.5 Primeros registros fósiles de nemátodos entomopatógenos	6
2.1.6 Biología general de nemátodos entomopatógenos	6
2.1.7 Taxonomía	7
2.1.8 Morfología	7
2.1.9 Ciclo de vida de los nemátodos entomopatógenos	8
2.1.10 Primera descripción de nemátodo entomopatógeno y sus bacterias simbiotes	10
2.2 Familias de nemátodos entomopatógenos Steinernematidae y Heterorhabditidae	13
2.3 El Suelo, reservorio natural de los nemátodos entomopatógenos	19
2.4 Factores que limitan la presencia de nemátodos entomopatógenos	19
2.4.1 Factores abióticos que afectan el desarrollo de nemátodos	19
2.4.2 Radiación solar	20
2.4.3 Humedad y aireación del suelo	20
2.4.4 La temperatura del suelo	20
2.4.5 pH	21
2.4.6 Plaguicidas	21
2.4.7 Textura	21
2.4.8 Oxígeno	22
2.5 Factores bióticos	22
2.5.1 Hospederos	22
2.5.2 Raíces de plantas y microflora de la rizosfera	23
2.6 Ecología	23
2.6.1 Distribución geográfica	23
2.7 Conducta de NEPs	24
2.8 Identificación morfológica y morfométrica	24
2.9 Identificación molecular	26
2.10 Producción masiva de NEPs	27

2.11 Efecto sobre organismos blanco	27
2.12 Comercialización de NEPs como agentes de control biológico	28
<b>III. Justificación</b>	29
<b>IV. Hipótesis</b>	29
<b>V. Objetivo general</b>	29
<b>VI. Objetivos particulares</b>	29
<b>VII. Materiales y métodos</b>	30
7.1 Área de estudio	30
7.2 Colecta de las muestras	30
7.3 Análisis de suelo	31
7.4 Aislamiento de NEPs	31
7.5 Propagación y conservación de nemátodos	32
7.6 Material biológico	32
7.6.1 Aislado de NEPs MC2-2014	32
7.6.2 Aislado de NEPs MC5-2014	33
7.6.3 Aislado XRPC1, XRPSI, XRPC4, XRPII, XRPSD, XRPID, XRPSI2	33
7.7 Bioensayos de patogenicidad	33
7.7.1 <i>Spodoptera frugiperda</i>	33
7.7.2 <i>Tenebrio molitor</i>	33
7.7.3 <i>Galleria mellonella</i>	34
7.7.4 Cuantificación de NEPS.	34
7.7.5 Patogenicidad de nemátodos	34
7.8 Análisis estadístico	35
7.9 Identificación taxonómica	35
7.9.1 Preparación de especímenes	35
7. Identificación taxonómica	35
7.9.1 Preparación de especímenes	35
7.9.2 Identificación morfológica	35
7.9.3 Identificación morfométrica	35
7.10 Identificación molecular	35
7.10.1 Extracción de DNA	36
7.10.2 Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	36
7.10.3 Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa	37
7.10.4 Análisis de secuencias de DNA	37
7.11 Bioensayo para monitoreo de ciclo biológico del aislado XRPC4	37
<b>VIII. Resultados y discusión</b>	38
8.1 Identificación morfológica	38
8.1.2 Aislado MC2-2014 <i>Heterorhabditoides chongmingensis</i>	39
8.1.3 Aislado MC5-2014 <i>Oscheius myriophila</i>	40
8.1.4 Identificación de morfométrica	44
8.2 Identificación molecular	49
8.3 Aislamiento de NEPs en cultivos de caña de azúcar en sus diferentes etapas fenológicas	50
8.4 Monitoreo de ciclo biológico del aislado XRPC4	52



8.5 Identificación morfológica del aislado XRPC4	53
8.6 Identificación morfométrica	53
8.7 Identificación molecular del aislado XRPC4	56
8.8 Resultados de patogenicidad y virulencia de la cepa XRPC4	57
<b>IX. Conclusión</b>	<b>59</b>
<b>Anexo I</b>	<b>60</b>
<b>Literatura citada</b>	<b>79</b>

## Índice de tablas y figuras

Tabla 1. Especies de NEPS y sus bacterias simbióticas	14
Tabla 2. Morfometría del aislado MC2-214 identificado como <i>H. chongmingensis</i> (mm)	45
Tabla 3. Comparación de morfometría de <i>H. chongmingensis</i>	46
Tabla 4. Morfometría del aislado MC5-2014 identificado como <i>Oscheius myriophila</i> (mm)	47
Tabla 5. Comparación de morfometría <i>Oscheius myriophila</i> (µm)	48
Tabla 6 Aislamiento positivos en Xochitepec.	
Tabla 7. Datos de aislamiento de NEPs en Real del puente Xochitepec, Morelos	51
Tabla 8. Morfometría XRPC4	54
Tabla 9. Relación de especies de nemátodos del Gen Bank	59
Tabla 10. Evaluación de virulencia cepa XRPC4	
Figura 1. Morfología interna de nemátodos	8
Figura 2. Ciclo biológico de los nemátodos entomopatógenos.	9
Figura 3. Mecanismo de acción de las bacterias simbiotas	10
Figura 4. Región ITS del rDNA	28
Figura 5. Método de toma y procesamiento de muestra	31
Figura 6. Parte anterior de <i>H. chongmingensis</i> .	39
Figura 7. Parte posterior de una hembra <i>H. chongmingensis</i>	39
Figura 8. Dibujos <i>H. chongmingensis</i>	40
Figura 9. <i>Oscheius myriophila</i> .	42
Figura 10. Dibujos <i>Oscheius myriophila</i> .	43
Figura 11. Amplificación de los aislados MC2 y MC5	49
Figura 12. Imagen satelital del área de estudio en el municipio de Xochitepec Morelos.	50
Figura 13. Bioensayo de monitoreo del ciclo biológico	52
Figura 14. Morfología interna aislado XRPC4	55
Figura 15. Amplificación del fragmento esperado	56

## Resumen.

En el presente proyecto de investigación se logró aislar, identificar y evaluar patogenicidad y virulencia de tres cepas de nemátodos entomopatógenos en suelos dedicados al cultivo de caña azúcar. La primera de las cepas abreviada como MC2-2014 tuvo identidad morfológica, morfométrica y molecular con *Heterorhabditoides chongmingensis*, reportada como nemátodo entomopatógeno asociado con la bacteria *Serratia* sp. reportada por primera vez en China. Con una  $CL_{50}$  de 19 JI en *D. magnifactella*. La segunda cepa MC5-2014 coincidió con *Oscheius myriophila* tanto morfológica, morfométrica y molecular, reportada con potencial para ser empleada como agente de control biológico aislada por primera vez en California. Con una  $CL_{50}$  de 21 JI en *D. magnifactella*. La tercera cepa XRPC4 se describió taxonómicamente y se comparó la identidad molecular en el NCBI encontrando un porcentaje de identidad del 97% con *Oscheius* sp. Se determinó la patogenicidad y virulencia sobre *Galleria mellonella* y *Tenebrio molitor*. Con dos concentraciones de 10 y 50 JI. *G. mellonella* obtuvo el 62% de mortalidad con 10 JI y 79% con 50 JI y una  $CL_{50}$  12 JI. En el caso de *T. molitor* se obtuvo el 8% de mortalidad con 10 JI y 75% con 50 JI y una  $CL_{50}$  de 25 JI. Este proyecto realizó diferentes contribuciones significativas para nuestro país ya que estas especies corresponderían al primer reporte geográfico nacional así como para Latinoamérica. La cepa XRPC4 *Oscheius* sp podría tratarse de una nueva especie. Es importante destacar la diversidad biológica presente en nuestro estado y es necesario desarrollar investigaciones en cuanto a diversidad, abundancia y fluctuación de especies a nivel nacional y estatal.

## Summary

In the present research project it will be detected to isolate, identify and evaluate pathogenicity and virulence of three strains of entomopathogenic nematodes in soils dedicated to the cultivation of sugar cane. The first of the abbreviated strains as MC2-2014 had morphological, morphometric and molecular identity with *Heterorhabditoides chongmingensis*, reported as entomopathogenic nematode associated with the bacterium *Serratia* sp. first reported in China. With an  $LC_{50}$  of 19 JI in *D. magnifactella*. The second strain MC5-2014 coincided with *Oscheius myriophila*, both morphological, morphometric and molecular, reported with the potential to be used as a biological control agent isolated for the first time in California. With an  $LC_{50}$  of 21 JI in *D. magnifactella*. The third strain XRPC4 is taxonomically described and the molecular identity in the NCBI is compared finding a 97% identity percentage with *Oscheius* sp. The pathogenicity and virulence on *Galleria mellonella* and *Tenebrio molitor* was determined. With two concentrations of 10 and 50 JI. *G. mellonella* obtained 62% mortality with 10 JI and 79% with 50 JI and a  $LC_{50}$  12 JI. In the case of *T. molitor*, 8% mortality was obtained with 10 JI and 75% with 50 JI and an  $LC_{50}$  of 25 JI. This project made different contributions for our country and its species corresponding to the first national geographic report as well as for Latin America. The strain XRPC4 *Oscheius* sp could be a new species. It is important to highlight the biological diversity present in our state and it is necessary to develop research in terms of diversity, abundance and fluctuation of species at national and state level.

## I.- Introducción

En los últimos 20 años las investigaciones en el control de insectos plaga se han centrado en la búsqueda de alternativas de control biológico empleando entomopatógenos endémicos como virus, bacterias, hongos y nemátodos. De estos grupos, los nemátodos entomopatógenos están considerados como una de las alternativas con más futuro para el control de insectos, debido a que poseen características comunes a depredadores, parasitoides y patógenos (Gaugler y Kaya, 1990; Poinar, 1990). Son capaces de buscar activamente a su presa, pueden ser patogénicos a un amplio intervalo de hospederos provocándoles la muerte de 24 a 48 horas. La actividad patógena es ocasionada por las bacterias con las que los nemátodos tienen una relación simbiótica. Los estudios reportan a las bacterias de los géneros *Xenorhabdus*, *Photorhabdus* y *Serratia* (Adams *et al.*, 2006). Debido a estas preeminencias estos organismos cuentan con un alto potencial para ser empleados en el control biológico, por lo que es necesario desarrollar investigaciones en base al aislamiento, identificación, evaluación, abundancia y distribución de nemátodos endémicos.

Se sabe que los nemátodos entomopatógenos se distribuyen a nivel mundial con excepción de la Antártida (Griffin *et al.*, 1990; Hominick, 2002). En México, desde 1980 se han realizado diversos trabajos sobre el aislamiento y evaluación de nemátodos entomopatógenos (Alatorre, 1971; Gaugler *et al.*, 1983 San-Blas, 2013); en los cuales reportaron especies pertenecientes a los géneros *Heterorhabditis* y *Steinernema*, no obstante, es necesario generar mayor información respecto a la distribución y diversidad en nuestro país. A nivel mundial se han reportado nuevas especies de nemátodos entomopatógenos pertenecientes a los géneros *Oscheius*, *Caenorhabditis* y *Heterorhabditoides* (Adams *et al.*, 2006), Castro en el 2010 aisló especies de nematodos nuevas para nuestro país, por lo que deben realizarse investigaciones que nos permitan conocer las especies de nemátodos entomopatógenos existentes en nuestro país, además de las condiciones y factores que propician su desarrollo debido a

que la supervivencia, virulencia y potencial reproductivo de estos organismos está influenciado por las condiciones ambientales (Ehlers, 1990).

Por lo anterior, en el presente trabajo se realizaron muestreos de suelo en la parcela de Real del Puente en Xochitepec, Morelos dedicadas al cultivo de caña para conocer la prevalencia y fluctuación de nemátodos entomopatógenos. Por tanto su aislamiento, identificación, evaluación de patogenicidad y virulencia, distribución y abundancia resultan importantes, para conocer la diversidad que existe en cuanto a especies y su fluctuación de acuerdo a la época del año, por lo que resulta trascendental generar esta información debido a que no existen reportes de este tipo en nuestro país.

## **II.- Antecedentes**

### **2.1 Nemátodos entomopatógenos**

#### **2.1.2 Definición de nemátodo entomopatógeno**

El término entomopatógeno tiene un origen griego entomon, se refiere a insectos y patógenos, que denota la enfermedad. Son metazoos multicelulares empleados en control biológico entre los patógenos microbianos y los depredadores / parasitoides, y se agrupan habitualmente con los patógenos, debido a su relación simbiótica con bacterias. Los nemátodos entomopatógenos (EPN) viven parasitariamente dentro del huésped infectado, por lo que se denominan endoparasitarios. Infectan muchos tipos de insectos que viven en el suelo, como las formas larvianas de polillas, mariposas, moscas y escarabajos, así como formas adultas de escarabajos, saltamontes y grillos. Los EPN son diversos, complejos y especializados; en un sentido estricto desde el punto de vista de la nematología y parasitología de insecto es considerado un nematodo entomopatógeno a los organismos con la capacidad de ocasionar la muerte de un insecto de manera eficiente con la ayuda de bacterias y estas bacterias asociadas deben de transmitirse a generaciones futuras (Poinar, 1983; Sudhaus, 2008; Adler *et al.*, 2012).

#### **2. 1.3 Asociación nemátodo-bacteria**

Existe una relación mutualista entre el nemátodo y la o las bacterias. Éstas no son capaces de sobrevivir en el suelo por tanto requiere del nemátodo en etapa J1 para su protección. Al carecer de habilidades para entrar al insecto depende del nemátodo para que lo transporte a la hemocele del insecto donde el nemátodo inhibe las defensas antibacterianas del hospedero (Morgan *et al.*, 1997; Kaya y Koppenhofer, 1999).

Por su parte el nemátodo recibe beneficios de la bacteria ya que ésta secreta enzimas que transforman el tejido del insecto en fuente de alimento para el nemátodo, además las bacterias producen toxinas y antibióticos, los primeros provocan una muerte rápida del insecto mientras los segundos no permiten el establecimiento de microorganismos oportunistas (Paul *et al.*, 1981; Richardson *et al.*, 1988; Li *et al.*, 1995; Hu *et al.*, 1998).

Las bacterias *Xenorhabdus* sp. y *Photorhabdus* sp. están asociadas a los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis*, respectivamente. Estas bacterias se localizan en el intestino del nemátodo o en una vesícula especializada, las bacterias de género *Serratia* han sido reportadas actualmente como simbioses de nemátodos de los géneros *Oscheius* y *Caenorhabditis* (Nguyen y Hunt, 2007; Zang *et al.*, 2008; Abebe *et al.*, 2010; Dillman *et al.*, 2012; Torini *et al.*, 2015).

#### **2.1.4 Variación de fase de las bacterias simbióticas**

Las bacterias *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* pueden presentar una forma de fenotipo inestable conocida como variación de las fase (Akurst *et al.*, 1988). Donde la fase I se caracteriza por la absorción de tintes y la producción de antibióticos. Y dependiendo de la especie y la raza puede ser pigmentada, bioluminiscente, producir lecitina, lipasas y desarrollar grandes inclusiones de cuerpos de proteínas cristal) (Akurst *et al.*, 1988; Nguyen y Smart, 1994; Kaya y Koppenhofer, 1999).

La fase II surge espontáneamente en la producción de nemátodos en medios artificiales o en la producción *in vitro*, en esta fase no produce antibióticos, no absorbe tintes y la producción de cristales de proteína es ineficiente

(Boemare *et al.*, 1996; Kaya y Koppenhofer, 1999). La base de la existencia de la fase II es desconocida (Nguyen y Smart, 1994)

### **2.1.5 Primeros registros fósiles de nemátodos entomopatógenos**

El filo nematoda es uno de los grupos más abundantes de organismos multicelulares en nuestro planeta. Los registros fósiles indican que los primeros invertebrados aparecieron hace aproximadamente 600 millones de años. Los restos de fósiles en ámbar del Líbano, indican que los nematodos (mermítidos) parásitos de insectos aparecieron hace 135-120 millones de años (Poinar, 2011).

### **2.1.6 Biología general de nemátodos entomopatógenos**

Los nemátodos 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 en algunas especies una bolsa caudal denominada bursa. 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; Gaugler, 2002).



### 2.1.7 Taxonomía

Existen 30 familias con potencial para ser empleadas como agentes de control biológico pertenecientes a cuatro órdenes: Rhabditida, Mermitida, Tylenchida y Aphelenchida (Smart y Nguyen, 1994). Dentro del orden Rhabditidae se encuentra la mayoría de los nemátodos de vida libre incluyendo a la familia Steinernematidae y Heterorhabditidae, parásitos facultativos de insectos (Tanada y Kaya, 1993; Smart y Nguyen, 1994). Los nemátodos pertenecen al Phylum Nematoda, de la clase Secernentea, del orden Rhabditida.

Las familias que han sido estudiadas por su potencialidad para el control biológico de insectos son: Tetradonematidae, Mermithidae, Allantonematidae, Neotylenchidae, Sphaerulariidae, Aphelenchidae, Rhabditidae, Steinernematidae y Heterorhabditidae (De Ley y Blaxter, 2002). Siendo las familias más estudiadas Steinernematidae y Heterorhabditidae donde se encuentran la mayoría de las especies descritas. Actualmente especies pertenecientes a la familia Rhabditidae han sido reportadas y descritas como nemátodos entomopatógenos, entre ellos *Oscheius chongmingensis*, *O. carolinensis*, *O. onorici* y *Caenorhabditis briggsae* (Nguyen y Hunt, 2007; Zang *et al.*, 2008; Abebe *et al.*, 2010; Dillman *et al.*, 2012; Torini *et al.*, 2015).

### 2.1.8 Morfología

Los NEPs son gusanos no segmentados, con sistema excretor, nervioso, digestivo, reproductivo y muscular (Figura 1B). Carente de sistema respiratorio y circulatorio; su cuerpo es cilíndrico. La parte anterior comprendida por labios externos pueden presentar papilas sensoriales, La parte interna comprende la cavidad bucal o estoma, esófago referido por algunos como faringe con presencia o ausencia de bulbos como pro corpus, meta corpus, post corpus; posteriormente el intestino, recto y ano (Poinar, 1979).

El sistema reproductivo masculino del nemátodo se inicia ventralmente dentro del recto formando la cloaca, pueden tener uno o dos testículos, poseen espículas que son

usadas como una estructura copulatoria. Las hembras presentan una vulva localizada ventralmente cerca de la mitad del cuerpo o posterior (Figura 1A) pero varía de acuerdo a la especie (Kaya y Stock, 1997). A continuación en la figura 1 puede observarse la morfología interna de los nemátodos en general, así como los sistemas con los que cuenta.

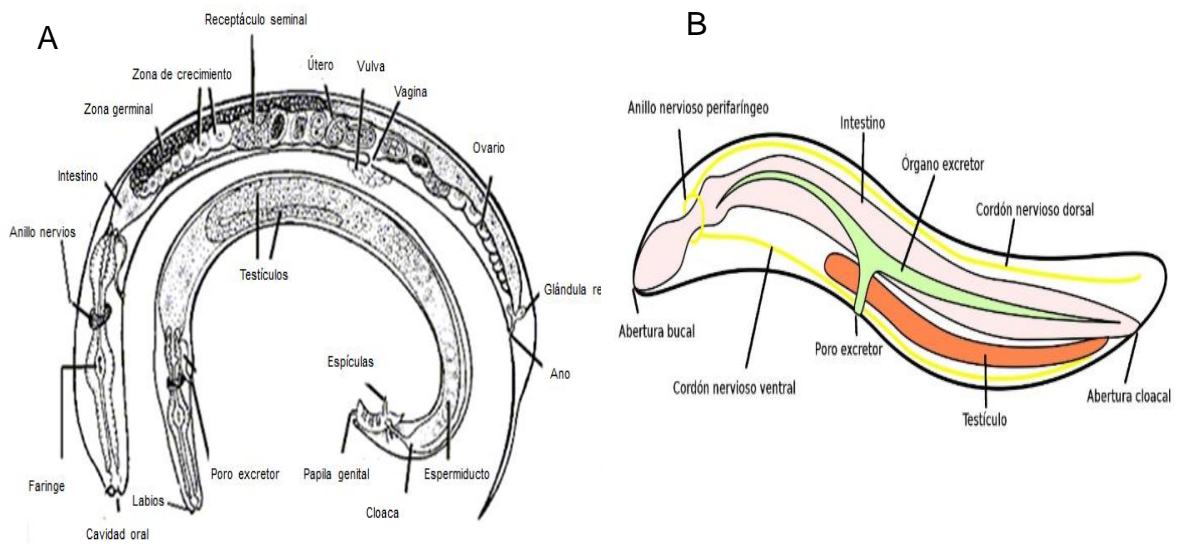


Figura 1. Morfología interna de nemátodos. A) Estructuras internas de nemátodos, B) sistema excretor, nervioso, digestivo, reproductivo y muscular de nemátodos.

### 2.1.9 Ciclo de vida de los nemátodos entomopatógenos

Presentan tres estados biológicos: huevo, larva y adulto. Los huevos y la larva joven pasan un periodo más corto como organismos de vida libre en el suelo, frecuentemente bajo condiciones acuáticas o húmedas (Poinar, 1990), ya que al terminarse los nutrientes, las larvas jóvenes 1 y 2 pasan al tercer estadio, conocido como Juvenil Infeccioso (JI), éstos entran al hospedero a través de aberturas naturales (boca, ano o espiráculos) o posiblemente por heridas y luego se dirigen hasta el hemocele; los JI de

*Heterorhabditis* poseen un diente dorsal que puede ayudar a la penetración. Una vez dentro del hospedero regurgitan a la bacteria con la que están asociados y comienzan a reproducirse los nemátodos.

En el caso de *Heterorhabditis*, con tan solo un nemátodo que penetre es suficiente para su reproducción ya que son hermafroditas; una vez que se agoten los nutrientes se vuelve a repetir el ciclo. En la figura 2 se muestra el ciclo biológico de los nemátodos entomopatógenos y en la figura 3 el mecanismo de acción de los NEPs.

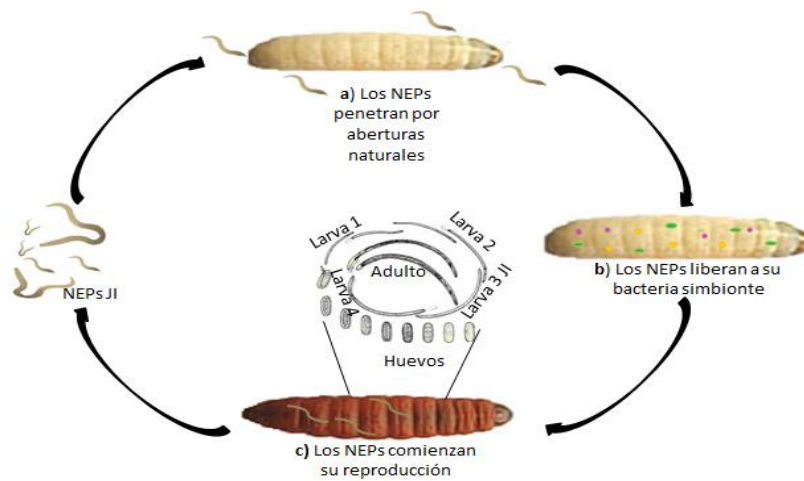
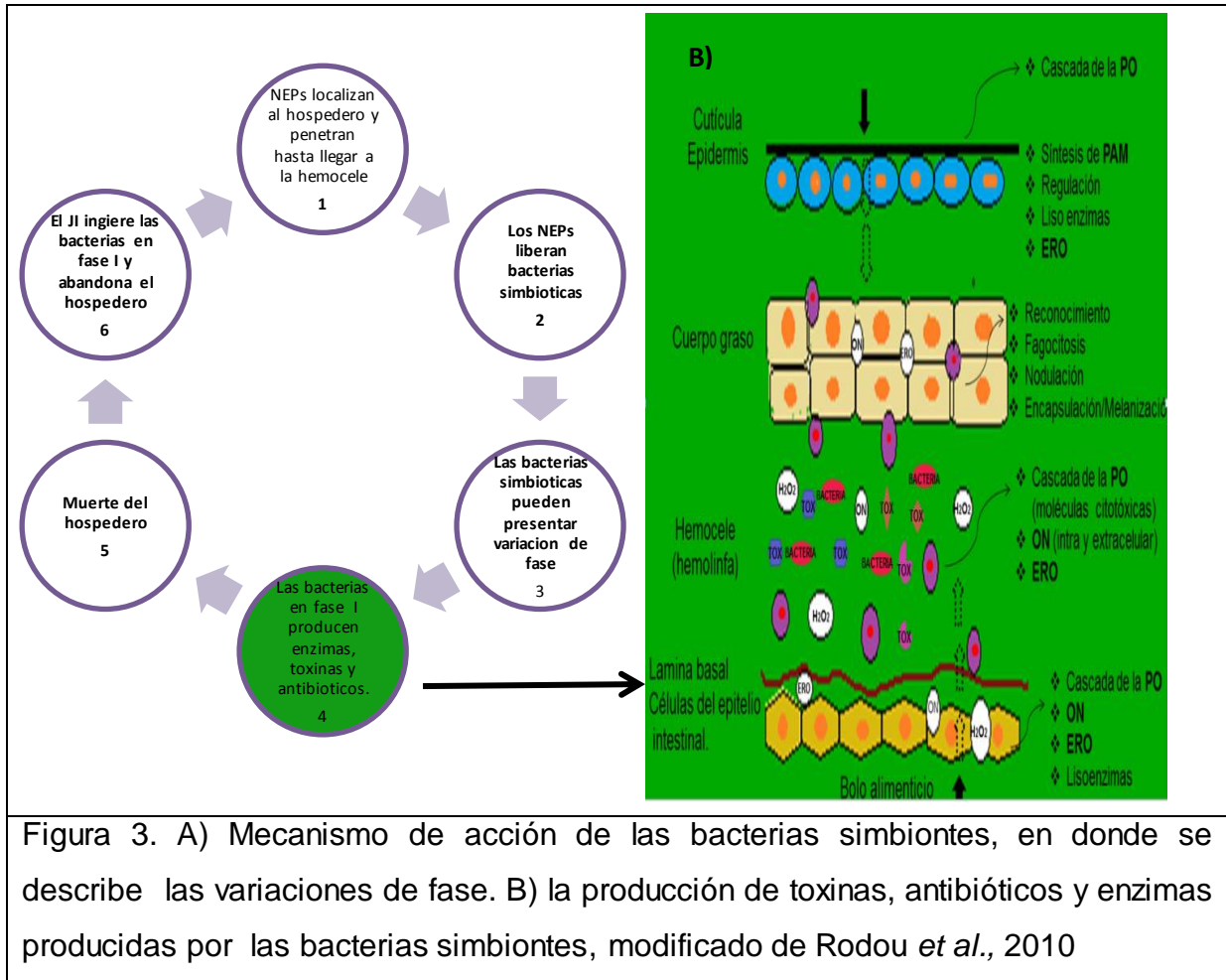


Figura 2. Ciclo biológico de los nemátodos entomopatógenos. Se muestra: a) Los NEPs (JI) penetrar por cualquier abertura natural al insecto; b) NEPs regurgitan las bacterias simbiotas; c) NEPs se reproducen dentro del insecto; los JI salen en busca de otro hospedero. Modificado de Dillman *et al.*, 2012

## Mecanismo de acción de NEPs



### 2.1.10 Primera descripción de nemátodo entomopatógeno y sus bacterias simbiotas

Steiner en 1923, describió el primer nemátodo entomopatógeno como *Aplectana kraussei* (ahora *Steinernema kraussei*). En ese momento no se consideró más que una curiosidad cuya posición sistemática era problemática. La posición sistemática del segundo nematodo entomopatógeno, *Neoplectana glaseri* Steiner (1929) a partir de

material aislado por Glaser y Fox (1930), aún no era segura y Steiner lo colocó en la familia Oxyuridae. No fue hasta que Jaroslav Weiser en 1955 describió una población europea de *Neoplectana carpocapsae* de larvas de polilla y Dutky y Hough en 1955 aislaron la cepa DD-136 de una steinernemátido no descrita de larvas de polilla del este de América del Norte que comenzaron estudios serios sobre la patogenicidad y la historia de vida de los nemátodos entomopatógenos.

Poinar y Thomas (1965) describieron la bacteria simbiótica (bajo el nombre de *Achromobacter nematophilus* asociada con *S. carpocapsae*. Luego se demostró la ubicación de las bacterias en la etapa infecciosa juvenil usando microscopía óptica y luego microscopía electrónica (Poinar, 1966; Poinar y Leutenegger, 1968). Describiendo así el papel de la bacteria en el desarrollo del nemátodo y la muerte del hospedero (Poinar y Thomas, 1966, 1967). Más tarde la bacteria se transfirió a un nuevo género, *Xenorhabdus* (Thomas y Poinar, 1979).

El género *Heterorhabditis* se describió en 1976 y la bacteria simbiótica luminiscente de *Heterorhabditis bacteriophora* se caracterizó como *Xenorhabditis* (Poinar, 1976; Thomas y Poinar, 1979). El carácter fascinante de las bacterias simbióticas de *Heterorhabditis* spp. era su capacidad de fluorescencia, tanto que todo el cadáver del insecto infectado brillaba en la oscuridad e incluso se podía detectar la luz en una sola etapa infecciosa (Poinar *et al.*, 1980a). Esta especie bacteriana fue luego transferida al género *Photorhabdus* (Boemare *et al.*, 1993). La ubicación de las células bacterianas en la etapa infecciosa se mostró con microscopía electrónica (Poinar *et al.*, 1977) (Fig. 4) y Milstead (1977) aclaró algunos aspectos de su comportamiento. Al igual que con *Steinernema*, hay muchas especies geográficas y cepas de *Heterorhabditis* (Poinar, 1990; Stock y Hunt, 2005) y la distribución global de *Heterorhabditis* y *Steinernema* indica que sus linajes estaban presentes cuando todas las masas de tierra se combinaron como el supercontinente Pangea.

Es interesante observar que un análisis genético mostró que *Heterorhabditis* es un grupo hermano de los strongylidos de vertebrados-parásitos y que ambos grupos

surgieron independientemente del grupo de *Rhabditis* de vida libre (Kiontke *et al.*, 2007). La asociación obligada de *Heterorhabditis* con un género único de bacterias simbióticas *luminiscentes*, su capacidad para ingresar al cuerpo de insectos sanos, la alternancia de generaciones sexuales y hermafroditas así como la morfología única de los adultos parásitos explica por qué a este género se le asignó el estado familiar.

Una característica única de los juveniles infecciosos de *Heterorhabditis* que falta en *Steinernema* y otros rhabdítidos es la presencia de un "gancho" dorsal en la punta de la cabeza. Esta estructura permite que los juveniles infecciosos ingresen a la cavidad corporal a través del tegumento externo de posibles huéspedes, así como a través de la tráquea y la pared intestinal (Bedding y Molyneux, 1982; Poinar y Georgis, 1990). Ahora es evidente que todas las especies de *Steinernema* tienen asociaciones mutualistas con especies de *Xenorhabdus*, mientras que todas las especies de *Heterorhabditis* tienen asociaciones simbióticas con especies de *Photorhabdus* (Akhurst y Boemare, 1990; Boemare, 2002). La elucidación de la simbiosis entre los nemátodos entomopatógenos y sus bacterias asociadas fue un importante punto de inflexión en el desarrollo de los nemátodos como agentes comerciales de control biológico. Dutky (1959) notó por primera vez las propiedades antibióticas de la bacteria asociada con *S. carpocapsae*, lo que explicaba cómo podía destruir las bacterias extrañas que invadían el cadáver del insecto que contenía los nemátodos en desarrollo. Desde entonces, varios antibióticos, incluyendo xenorhabdinas, xenocaumacinas, hidroxiestilbenos, derivados de indol y derivados de antraquinona, se recuperaron de cultivos de *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* (Webster *et al.*, 2002).

Akhurst (1980) descubrió que en cultivo, *Xenorhabdus* existía en dos (o más) variantes de fase genéticamente idénticas que diferían en la morfología de la colonia, el color de la colonia y la actividad antimicrobiana. La fase primaria, que se lleva a cabo por etapas infecciosas naturales, proporcionó el máximo crecimiento de nemátodos y la producción de antibióticos. Pero la fase primaria volvería repentinamente a una fase secundaria, que era mucho menos favorable al crecimiento de nemátodos y tenía una producción limitada de anticuerpos. Este cambio fue un obstáculo importante en la producción

comercial de los nemátodos. La causa de este repentino cambio de fase era desconocida hasta que se descubrió un bacteriófago de *Heterorhabditis* que solo atacaba la fase primaria. El cambio a la fase secundaria sería una respuesta de supervivencia de la fase primaria de *Xenorhabdus* (Poinar *et al.*, 1980b; Poinar *et al.*, 1989).

## **2.2 Familias de nemátodos entomopatógenos Steinernematidae y Heterorhabditidae**

El orden Rhabditida contiene a la mayoría de los nemátodos de vida libre, donde están agrupadas las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae, ambas familias incluyen especies que son parásitos facultativos patógenos de insectos, siendo los principales géneros *Steinernema*= *Neoaplectana* y *Neosteinerema* (familia Steinernematidae) y *Heterorhabditis* (familia Heterorhabditidae) (Poinar, 1990; Nguyen y Smart, 1994). Como ya se ha mencionado anteriormente denominan entomopatógenos debido a la capacidad que tienen para penetrar el cuerpo de algunas especies de insectos plaga. Aunque el nemátodo no mata directamente al insecto, la asociación que se establece entre el nemátodo y la bacteria es considerada mutualista, ya que la bacteria es la responsable directa de la muerte del insecto pero ambos se benefician. La bacteria por sí sola no puede penetrar dentro del hemocele de los insectos hospederos y los nemátodos no pueden crecer y reproducirse en ausencia de la bacteria (Georgis y Poinar, 1994). En la actualidad algunas de sus especies son ampliamente reconocidas por su potencial de control biológico (Dowenes y Griffin, 1996) y causantes de algunas importantes epizootias (Akhurst *et al.*, 1992). En el Cuadro 1 se describen las especies reportadas de nemátodos entomopatógenos y las bacterias con las que existe una asociación simbiótica.

Tabla 1. Especies de NEPS y sus bacterias simbióticas

<b>Género del nemátodo</b>	<b>Especie del nemátodos</b>	<b>Bacteria simbiótica</b>
<b><i>Steinernema</i></b>	<i>S. abbasi</i>	Sin describir
	<i>S. affine</i>	Sin describir
	<i>S. anatoliense</i>	Sin describir
	<i>S. arenarium =anomali</i>	<i>Xenorhabdus hominickii</i> ,
	<i>S. ashiuense</i>	<i>Xenorhabdus kozodoii</i>
	<i>S. asiaticum</i>	Sin describir
	<i>S. apuliae</i>	Sin describir
	<i>S.austral</i>	<i>Xenorhabdus kozodoi</i>
	<i>S. backanense</i>	Sin describir
	<i>S. boemarei</i>	Sin describir
	<i>S. brazilense</i>	Sin describir
	<i>S. bicornutum</i>	Sin describir
	<i>S. carpocapsae</i>	<i>Xenorhabdus budapestensis</i>
	<i>S. caudatum</i>	<i>Xenorhabdus nematophila</i>
	<i>S. ceratophorum</i>	Sin describir
	<i>S. cholashanense</i>	Sin describir
	<i>S. costariencense</i>	Sin describir
	<i>S. colombiense</i>	Sin describir
	<i>S. cubanum</i>	Sin describir



<b>Género del nemátodo</b>	<b>Especie del nemátodos</b>	<b>Bacteria simbiótica</b>
	<i>S. diapresi</i>	<i>Xenorhabdus poinari</i>
	<i>S. eapokense</i>	<i>Xenorhabdus doucetiae</i>
	<i>S. everestence</i>	Sin describir
	<i>S. feltiae(=bibionis)</i>	Sin describir
	<i>S. glaseri</i>	<i>Xenorhabdus bovienii</i>
	<i>S. guangdongense</i>	<i>Xenorhabdus poinarii</i>
	<i>S. hebeiense</i>	Sin describir
	<i>S. hermaphroditum</i>	Sin describir
	<i>S. ichnusae</i>	Sin describir
	<i>S. intermedium</i>	Sin describir
	<i>S. jolietii</i>	Sin describir
	<i>S. kariii</i>	Sin describir
	<i>S. khoisanae</i>	<i>Xenorhabdus hominickii</i>
	<i>S. kraussei</i>	Sin describir
	<i>S. kushidae</i>	Sin describir
	<i>S. loci</i>	<i>Xenorhabdus japonica</i>
	<i>S. leizhouense</i>	<i>Sin describir</i>
	<i>S. longicaudum</i>	<i>Sin describir</i>
	<i>S. masoodi</i>	<i>Sin describir</i>
	<i>S. minutum</i>	<i>Sin describir</i>
	<i>S. monticolum</i>	<i>Sin describir</i>

Género del nemátodo	Especie del nemátodos	Bacteria simbiótica
	<i>S. neocortillae</i>	<i>Xenorhabdus hominickii</i>
	<i>S. oregonence</i>	Sin describir
	<i>S. pakistanense</i>	Sin describir
	<i>S. puertoricense</i>	Sin describir
	<i>S. pui</i>	<i>Xenorhabdus romanii</i>
	<i>S. puntauvense</i>	Sin describir
	<i>S. rarum</i>	Sin describir
	<i>S. riobrave</i>	<i>Xenorhabdus szentirmaii</i>
	<i>S. ritteri</i>	<i>Xenorhabdus cabanillasii</i>
	<i>S. robustispiculum</i>	Sin describir
	<i>S. sangi</i>	Sin describir
	<i>S. sasonense</i>	<i>Xenorhabdus vietnamensis</i>
	<i>S. scarabaei</i>	Sin describir
	<i>S. seemae</i>	<i>Xenorhabdus koppenhoeferi</i>
	<i>S. serratum</i>	Sin describir
	<i>S. siamkayai</i>	<i>Xenorhabdus ehlersii</i>
	<i>S. sichuanense</i>	<i>Xenorhabdus stockiae</i>
	<i>S. silvaticum</i>	Sin describir
	<i>S. tami</i>	Sin describir
	<i>S. thanhi</i>	Sin describir
	<i>S. thermophilum</i>	Sin describir

<b>Género del nemátodo</b>	<b>Especie del nemátodos</b>	<b>Bacteria simbiótica</b>
	<i>S. unicornum</i>	<i>Xenorhabdus indica</i>
	<i>S. websteri</i>	Sin describir
	<i>S. weiseri</i>	Sin describir
	<i>S. xueshanense</i>	Sin describir
	<i>S. yirgalemense</i>	Sin describir
	<i>Steinernema sp</i>	<i>Xenorhabdus miraniensis</i>
	<i>Steinernema sp</i>	<i>Xenorhabdus mauleonii</i>
<b><i>Neosteinerinema</i></b>	<i>N. longicurvicauda</i>	Sin describir
	<i>H. amazonensis</i>	<i>Photorhabdus</i>
<b><i>Heterorhabditis</i></b>		<i>luminescens subp. Kayaii</i>
	<i>H. bacteriophora</i>	Sin describir
	<i>H. baujardi</i>	Sin describir
	<i>H. brevicaudis</i>	<i>Photorhabdus temperata</i>
	<i>H. downesi</i>	Sin describir
	<i>H. floridensis</i>	<i>Photorhabdus luminescens</i>
	<i>H. georgiana</i>	<i>Photorhabdus asymbiotica</i>
	<i>H. gerrardi</i>	<i>Photorhabdus luminescens</i>
	<i>H. indica</i>	Sin describir
	<i>H. marelatus</i>	<i>Photorhabdus temperata</i>
	<i>H. megidis</i>	Sin describir

<b>Género del nemátodo</b>	<b>Especie del nemátodos</b>	<b>Bacteria simbiótica</b>
	<i>H. mexicana</i>	Sin describir
	<i>H. poinari</i>	Sin describir
	<i>H. safricana</i>	<i>Serratia</i>
	<i>H. sonorensis</i>	<i>Serratia</i>
	<i>H. taysearae</i>	Sin describir
	<i>H. zealandica</i>	Sin describir
<b><i>Oscheius</i></b>	<i>O. chongmingensis</i>	Sin describir
	<i>O. carolinensis</i>	Sin describir
<b><i>Caenorhabditis</i></b>	<i>C. briggsae</i>	Sin describir
	<i>C. brenneri</i>	Sin describir
<b><i>Heterhorhabditoides</i></b>	<i>H. chongmingensis</i>	<i>Serratia</i> sp.

---

Modificado de Boemare *et al.*, 1993; Boemare *et al.*, 1996; Boemare, 2002

## **2.3 El Suelo, reservorio natural de los nemátodos entomopatógenos**

Los nemátodos entomopatógenos se han recuperado de suelos de muchas partes del mundo, su presencia y distribución están influenciadas por factores geográficos y ecológicos, abundancia de las especies, insectos hospederos, vegetación nativa, región climática y tipo de suelo. Diversas investigaciones muestran que algunas especies de nemátodos se desarrollan en determinadas condiciones, como por ejemplo *Steinernema carpocapsae* y *Steinernema feltidae* en regiones templadas, mientras que en zonas con climas continentales y mediterráneos se puede encontrar a *Heterorhabditis bacteriophora*, mientras que *Heterorhabditis indica* se puede encontrar en trópicos y subtrópicos. Otras especies tales como *Steinernema rarum*, *Steinernema kushidai*, *Steinernema ritteri* y *Heterorhabditis argentinensis* parecen tener una distribución mucho más restringida. Algunas especies de nemátodos parecen tener una distribución global y son esencialmente ubicuos (Hominick, 2002).

## **2.4 Factores que limitan la presencia de nemátodos entomopatógenos**

Los factores que afectan la presencia y reproducción de los Nemátodos Entomopatógenos (NEP) son la humedad excesiva en el suelo, la alcalinidad, desprendimiento de bióxido de carbono en la raíz, textura del suelo y temperatura. Todas estas propiedades del suelo influyen potencialmente en la actividad del nemátodo. Los factores abióticos que limitan la supervivencia de los nemátodos son: suelo, plaguicidas, topografía y labores culturales mientras que los factores bióticos son: hospederos, enemigos naturales, enfermedades, raíces y rizosfera (Akhurst, 1986).

### **2.4.1 Factores abióticos que afectan el desarrollo de nemátodos**

El suelo es un sistema compuesto por tres fases, una fase sólida compuesta por agregados minerales y orgánicos cuya disposición permite la existencia de una cantidad variable de poros, puede ser muy heterogénea dada la diversidad de materiales que la pueden conformar; una fase líquida formada por el agua de la disolución del suelo (poros rellenos de agua), y una fase gaseosa que es la atmosfera del suelo contenida

en el espacio poroso (poros vacíos). Así pues, la estructura y textura del suelo afectan el movimiento y la persistencia de los nemátodos ya que éstos son incapaces de moverse entre las partículas del suelo cuando los diámetros de los poros formados son menores que el ancho de su cuerpo, de tal manera que su habilidad de dispersión disminuye conforme los porcentajes de limo y arcilla se incrementan en el suelo. Según Ames y Smart (1989) un suelo que contiene más del 20% de arcilla puede restringir la migración de *Steinernema* en suelos arcillosos, incluso, aún en presencia de algún hospedero (Georgis y Poinar, 1993)

#### **2.4.2 Radiación solar**

Entre los principales factores abióticos que afectan a los NEPs se encuentra la luz ultravioleta (Gaugler y Boush, 1978; Gaugler *et al.*, 1992). En un estudio donde se expuso a luz solar a *S. carpocapse* este fue inactivado a los 60 minutos, mientras que *H. bacteriophora* fue más sensible en menor tiempo al inactivarse a los 30 minutos, mientras que en lámpara con luz UV los tiempos fueron 6 y 2 minutos respectivamente. En la especie *S. kushidia* se reporta una mortalidad del 100% en JI al estar expuestos durante 40 minutos bajo lámpara UV (Fujie y Yokoyama, 1998).

#### **2.4.3 Humedad y aireación del suelo**

El contenido de humedad en el suelo puede fluctuar ampliamente, sin embargo, los nemátodos necesitan en el suelo un medio aeróbico y acuático para sus actividades (Simons, 1973). La humedad del suelo se considera el factor más importante que influye en la sobrevivencia de los nemátodos porque el movimiento de los nemátodos dentro de los suelos requiere poros llenos de agua o películas de espesor suficiente (Wallace, 1958), no obstante, se sabe que los JI son capaces de sobrevivir a la desecación por periodos relativamente largos.

La aireación del suelo está relacionada con los niveles de consumo de oxígeno y producción de CO<sub>2</sub>. El oxígeno es reemplazado gracias a la difusión de la atmósfera dentro de los poros del suelo. Los gradientes de gases son establecidos por actividades

biológicas y químicas en el suelo y la proporción de difusión es controlada por las propiedades físicas del mismo (Richardson y Grewal, 1994).

#### **2.4.4 La temperatura del suelo**

El intervalo de temperatura a la que los nemátodos pueden sobrevivir, infectar y reproducirse varía entre las cepas y especies; las temperaturas de 35 °C en periodos prolongados son perjudiciales a los juveniles infectivos, aunque ésta condición no se experimenta en el campo, a menos que el cadáver del hospedero este en la superficie del suelo.

#### **2.4.5pH**

Existen reportes que sugieren que los JI pueden tolerar una gran variedad de valores de pH que van de 8 a 4 y que un pH de 10 reduciendo la sobrevivencia drasticamente Kung *et al.* (1990), a un pH 4 en especies de *Steinernema* como *S. krausse* reduce la patogenicidad y sobrevivencia, limitando su parasitismo en *Cephalcia abietis* (L) (Hymenoptera), por lo que se infiere que el pH ácido los afecta (Fischer y Fuher, 1990)

#### **2.4.7Plaguicidas**

Aunque las especies de *Steinernema* y *Heterorhabditis* sean compatibles a muchos plaguicidas químicos y pueden ser aplicadas junto con ellos en sistemas de manejo integrado de plagas (Kaya, 1985), la exposición por tiempos largos a algunos compuestos es perjudicial. En estudios por Rovesti *et al.* (1988), en donde se evaluó el efecto de 75 plaguicidas, encontró que las proporciones de aplicación recomendadas de los fungicidas, herbicidas y nematicidas y un regulador de crecimiento eran tóxicos a *H. bacteriophora*. Algunos plaguicidas tuvieron un efecto transitorio, los nemátodos se recuperaron rápidamente después de que se lavaron o se colocaron en arena (Rovesti y Deseo, 1990).

#### **2.4.8 Textura**

La textura del suelo afecta la movilidad, persistencia e infectividad del nemátodo (Georgis y Poinar, 1983; Cho y Kaya, 1991). Las texturas arenosas son las más favorables (Baker y Capinera, 1997) las texturas limo, limo arcillosas al ser el diámetro de los poros pequeño reduce la aireación, aspecto que influye en la supervivencia de los nemátodos (Kaya, 1990; Molineux y Bedding, 1986).

#### **2.4.9 Oxígeno**

La tolerancia de los nemátodos a la falta de oxígeno varía drásticamente entre especies (Grewal, 1999; Qui y Bedding, 2000). Los niveles de oxígeno en el interior de los nemátodos dependen del oxígeno del ambiente y el tamaño del cuerpo. *S. carpocapsae* puede sobrevivir a niveles bajos de oxígeno (0.5% de saturación) solo 43 días a 20° C (Burman y Pye, 1980). En otra investigación se con esta misma especie determinaron que la tasa de respiración depende de la temperatura y que bajas concentraciones de oxígeno tales como (0.5%ml/5x 10<sup>5</sup> eran letales para el nematodos (Lindegren *et al.*, 1986;

Por lo que el oxígeno puede llegar a ser un factor limitante, tomando en cuenta que en suelos con alto contenido de arcilla, materia orgánica o saturada por agua, tendrá una influencia en la supervivencia de los nemátodos ( Kaya, 1990; Qui y Bedding, 2000)

#### **2.5 Factores bióticos**

La presencia y reproducción de los nematodos se ve limitada en gran medida por la disponibilidad de hospederos ( Baker y Capinera, 1997) y a la abundancia de enemigos naturales (Bird y Birt, 1991; Kaya y Koppenhofer, 1996, Grewal, 1999). Entre los enemigos naturales se encuentran los microartropodos como colembolas y acaroscon hábitos nematofagos (Epsky *et al.*, 1988)

En los ecosistemas naturales los microorganismos que habitan el suelo en varios niveles tróficos viven en un estado de homeostasis ecológico. Los nemátodos



introducidos en tales ambientes se enfrentan a la depredación y parasitismo por la fauna endémica del suelo (Ishibashi y Kondo, 1987) ya que existe una gran variedad de virus, bacterias, hongos y protozoarios que pueden reducir las poblaciones de nemátodos (Kaya y Koppenhofer, 1996).

### **2.5.1 Hospederos**

Se conoce que los nemátodos entomopatógenos tienen un amplio intervalo de hospederos. Se sabe que *S. carpocapsae* infecta a cerca de 250 especies de insectos en 75 familias y 11 órdenes (Poinar, 1979). En condiciones de campo, la infectividad de un nematodo en particular se reduce a pocas especies y estadios de insectos (Simoes, 1996; Georgis, 1992) tomando en cuenta los hábitos, conducta de los nemátodos y la defensa de los insectos (Glazer, 19996; Simons y Rosa, 1996).

### **2.5.2 Raíces de plantas y microflora de la rizosfera**

Las raíces de las plantas pueden influir en la movilidad de búsqueda del hospedero de rhabdítidos infectivos (Birt y Birt, 1986; Hominick *et al.*, 1996.). En experimentos de laboratorio encontraron que la habilidad de búsqueda del hospedero se ve afectada adversamente por la densidad de las raíces, esto puede deberse a que la densidad del sistema radicular podría haber cambiado las características bióticas y abióticas del suelo e influido en la porosidad, composición química o poblaciones de los microorganismos (Choo *et al.*,1995;; Negrete, 2013).

## **2.6 Ecología**

### **2.6.1 Distribución geográfica**

Los nemátodos entomopatógenos presentes en todos los continentes a excepción de la Antártida (Hominick *et al.*, 1997) y han sido aislados en diferentes tipos de suelo desde nivel del mar hasta grandes altitudes, en hábitat naturales y agro sistemas perturbados (Hominick y Briscoe, 1997). Lo cual nos ayuda a analizar y comparar las adaptaciones morfológicas, fisiológicas y de comportamiento de estos organismos dependiendo del

nicho ecológico que habitan junto a insectos hospederos. Las diferencias en adaptaciones pueden resultar en la especialización, tanto del hospedero como del nemátodo parásito. Grewal *et al.*, (1994) mencionan que las especies de nemátodos entomopatógenos que están adaptados a temperaturas frías serán más efectivas parasitando y reproduciéndose en insectos que son más activos durante el invierno, mientras que las especies cálidas pueden ser más efectivas durante el verano.

Esto indica la importancia de buscar nuevos agentes biológicos adaptados a las condiciones donde se encuentra el insecto blanco, ya que el desarrollo, maduración y la reproducción de los nemátodos entomopatógenos está definido por las condiciones térmicas (Grewal *et al.*, 1994), propiedades del suelo y vegetación que se encuentran en las localidades; éstas en conjunto afectan directa o indirectamente al nemátodo (Wallace *et al.*, 1993) al igual que las bacterias, hongos, macro y microorganismos que se encuentran en los suelos, repercutiendo directamente en la persistencia o disminución de la población de los nemátodos (Ishibashi y Kondo, 1987).

## **2.7 Conducta de NEPs**

Los NEPs poseen comportamiento que les permite buscar e infectar a los insectos hospederos. La estrategia de búsqueda se divide en dos categorías: “acechadora y cazadora” (Gaugler *et al.*, 1989; Cambell y Gaugler, 1993; Lewis *et al.*, 1992).

Las especies acechadoras son estacionarias y pueden pararse sobre la parte posterior y brincar a su hospedero: *S. carpocapsae* (Campbell y Kaya, 1999), lo que les permite infectar insectos móviles que se alimentan en la inter fase de la basura del suelo (Campbell *et al.*, 1996). *S. glaseri* y *H. bacteriophora* realizan una búsqueda activa; esta conducta la tienen la mayoría de los NEPs donde se caracterizan por ser nemátodos muy móviles y pueden explorar grandes áreas (Lewis *et al.*, 1993; Gaugler, 1999).

Existen especies como *S. riobrave* y *S. feltiae* que presentan características de conducta acecharora y cazadora (Campbell y Gaugler, 1997; Campbell y Kaya, 2002)

## **2.8 Identificación morfológica y morfométrica**

Un estudio cualitativo y cuantitativo de los caracteres que definen a un organismo se denomina caracterización, esta consiste en la identificación de caracteres morfológicos, fisiológicos, de comportamiento y genéticos. Esto posibilita un reconocimiento de los aislados más adaptados a una localidad específica y facilita el entendimiento de las relaciones patógeno-hospedero a través de la información relacionada con la variación de la estructura poblacional. Estos aspectos son importantes cuando se pretende inducir o establecer un patógeno para el control permanente de una plaga o cuando se quiere evaluar el impacto ambiental resultante de la aplicación de un organismo (Sosa *et al.*, 1998).

Los métodos morfológicos clásicos han sido aplicados sucesivamente para la descripción, identificación y clasificación de nemátodos entomopatógenos para género y especie (Curran, 1990; Poinar, 1990).

Así mismo (Nguyen y Smart,1997) recomiendan la siguiente simbología común y abreviaturas usadas, en la morfometría de los juveniles infectivos de 1ª y 2ª generación de *Steinernema* y *Heterorhabditis*: L= longitud total del cuerpo; W= anchura máximo del cuerpo; EP= distancia de la parte anterior al poro excretor; NR= distancia de la parte anterior al anillo nervioso; ES= distancia de la parte anterior a la base del esófago; T= distancia del ano a la punta de la cola; a=Longitud total del cuerpo/ anchura mayor del cuerpo; b= Longitud total del cuerpo/distancia de la parte anterior al esófago; C=Longitud total del cuerpo/longitud de la cola; D% distancia de la parte anterior al esófago X100; E% distancia de la parte anterior al poro excretor/longitud de la cola X100.

Por otro lado existen diversas claves taxonómicas basadas en juveniles infectivos de tercer estadio para especies de *Steinernema* (Doucet, 1990) y para juveniles infectivos y machos de especies de *Steinernema* y *Heterorhabditis* (Nguyen y Smart, 1996; Stock y Kaya, 1996).

## 2.9 Identificación molecular

Esta técnica se basa en la caracterización e identificación de especies utilizando marcadores moleculares de DNA y RNA. Actualmente la secuenciación de la región espaciadora interna transcrita (ITS) y de la subunidad grande (LSU o 28S) del DNA ribosomal (rDNA) nuclear es una de las secuencias más utilizadas en la caracterización molecular de nemátodos a nivel de género y especie (Esmelianoff *et al.*, 2008; Nguyen *et al.*, 2008; Mrápek Z *et al.*, 2006; Mancilla *et al.*, 2004; Stock *et al.*, 2001). Debido a que los genes ribosomales presentan una secuencia bastante conservada en los organismos eucariontes ayudando a la identificación y determinación de relaciones filogenéticas.

La técnica consiste en amplificar estas regiones conservadas por PCR y posteriormente secuenciar los fragmentos amplificados para someter las secuencias a un BLAST del GenBank (National Center of Biotechnology Information) y comparar en la base de secuencias existentes. En la Figura 4 la región ITS contiene dos regiones (ITS1 e ITS2 e incluye también la región 5.8S) no codificadoras variables dentro de cada repetición de DNA; y se localizan entre las regiones altamente conservadas de los genes, RNAr 18S (SSU-18S), región 5.8S y los genes que codifican para RNAr de la subunidad grande del ribosoma (LSU-28S).

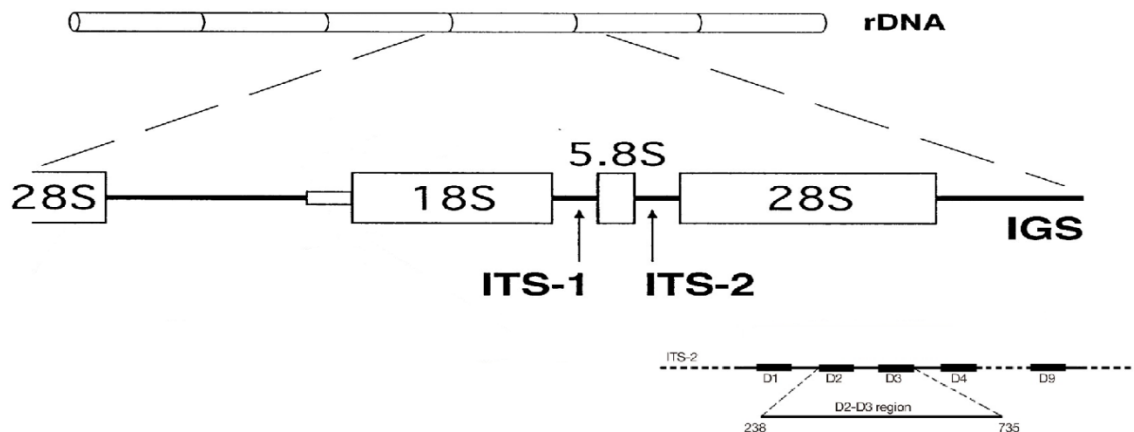


Figura 4. Región ITS del rDNA, donde se muestra la imagen de las regiones ITS1, 5.8, ITS2 y 28S-LSU. Así como la región D2D3 comprendida en el 28S.

## **2.10 Producción masiva de NEPs**

Los NEPs se pueden producir in vivo e in vitro, para pruebas de laboratorio o para la producción comercial (Friedman, 1990). La producción in vivo es el método de producción convencional en donde se emplean insectos los cuales son infectados con JI, el insecto que principalmente se emplea es *G. mellonella*, este tipo de producción es de buena calidad pero requiere de mucha mano de obra y es costosa a gran escala (Shapiro, 2003).

Para la producción a gran se emplea la producción in vitro ya sea en medios solidos o fermentación liquida (Ehlers, 1996; Grewal y Georgia, 1998).

El método de medio solido de tres dimensiones, utiliza espuma de poliuretano revestido con un medio nutritivo, inicialmente inoculado con las bacterias simbióticas y luego con las bacterias. La producción en medio solido es barata, no se requiere amplia experiencia y la logística de producción es flexible.

## **2.11 Efecto sobre organismos blanco**

Las evaluaciones en laboratorio y en campo de NEPs se ha mostrado que cerca de 17 órdenes y 135 familias de insectos plaga son susceptibles (Akhurst y Smith, 2002). Este amplio número de hospederos es una de las principales ventajas e interés en el aislamiento, identificación y evaluación de NEPs, no obstante es necesario desarrollar investigaciones de infectividad en campo ya que la mayoría de los reportes de infectividad han sido demostrado en caja Petri en donde el insecto está en contacto permanente con el nematodo bajo condiciones óptimas y donde las barreras ecológicas y de comportamiento han sido removidas (Kaya y Koppenhöfer, 1999).

## **2.12 Comercialización de NEPs como agentes de control biológico. Me parece que esto no va aquí, me queda claro que hacia allá va la investigación,**

Las técnicas exitosas de producción masiva ha sido la clave del éxito en la comercialización de NEPs. El cultivo *in vitro* (cultivo monoxénico en líquido) ha garantizado la producción constante, de nematodos de calidad y ha reducido los costos de producción (Friedman, 1990).

El desarrollo de formulaciones ha facilitado la aplicación exitosa de quién??y el aumento de persistencia de quién?? a incrementando su efectividad (Iopez, 2002). Existen diferentes tipos de formulaciones como matrices de geles (alginato, arcilla, poliacrilamida, entre otras), con diversas presentaciones (solidas, semisólidas y liquidas) (Georgis y Hom, 1992; Hominick y Collins, 1997).

Es importante mencionar el papel de la tecnología en el éxito de la producción y comercialización de los productos a base de NEPs, como los sistemas de riego, diversos equipos de pulverización, ya que la elección de equipos de aplicación y la manera en cómo se apliquen, tiene un impacto sustancial sobre la eficacia del control de la plaga.

Los NEPs son principalmente usados como agentes de control biológico inundativo y los JI son liberados en número masivo normalmente de  $2.5 \times 10^9$  JI/ha, el cual tiene como objetivo obtener una supresión inmediata de la plaga (Georgis y Manweiler, 1994). La susceptibilidad del insecto, su comportamiento ecológico, formulación, facilidad de uso, almacenamiento y costo del producto ha limitado el uso de nemátodos para ciertos insectos y mercados (Georgis, 2002).

Las tres principales compañías que lidereaban la comercialización de los nemátodos entomopatogenos eran: Thermotriology Ltda®, Microbio Ltda® y Koppert Ltda®, distribuyendo sus productos por medio de patentes, en más de 80 compañías comercializan productos con solo 8 especies de NEPs de las 35 registradas (Lopez, 2002).

Más de la mitad de los productos existentes en el mercado (68%), se han desarrollado con base en dos especies: *Steinernema carpocapsae* (37%) y *Heterorhabditis bacteriophora* (31%); otros productos incluyen especies como *S. feltiae* (17%), *H. megidis* (5%), *S. glaseri*, *H. indica*, *H. marelatus* (3% c/u) y *S. riobrave* (1%) (López, 2002).

### **III.- Justificación**

Los trabajos de aislamiento de nemátodos entomopatógenos se han centrado en aislamiento identificación y evaluación, reportando en su mayoría a especies pertenecientes a heterorhabdítidos y steinernemátidos en diversos cultivos. Un trabajo realizado en caña de azúcar, aisló nuevas especies de nemátodos entomopatógenos a las reportadas a nivel nacional y mundial. Dicho dicho trabajo identificó a una de las tres especies aisladas por lo que resulta trascendental dar continuidad a este trabajo realizando la identificación morfológica, morfométrica, molecular y determinación del posible intervalo de hospederos, así como realizar nuevos aislamientos en una parcela de caña de azúcar por dos ciclos de cultivo para conocer como es la abundancia y fluctuación de NEPs

### **IV.- Hipótesis**

Los nemátodos NEPs aislados serán patógenos a por lo menos una especie de lepidópteros y coleópteros. La identificación molecular será similar a la identificación morfológica.

### **V.- Objetivo general**

Determinar la identidad de los aislados MC2, MC5 y XRPC1 y evaluar su patogenicidad y virulencia sobre *Galleria mellonella* (L) y *Tenebrio molitor*.

### **VI.- Objetivos particulares**

Aislar nemátodos entomopatógenos en la parcela de Real del Puente de Xochitepec, Morelos dedicadas al cultivo de caña de azúcar, en sus diferentes etapas fenológicas.

Determinar la identidad de los aislados MC2 y MC5 de NEPs en caña de azúcar con las técnicas taxonómicas.

Determinar la identidad de los NEPs aislados en la parcela de Xochitepec, Morelos con las técnicas taxonómicas y moleculares.

Determinar la patogenicidad y virulencia de los aislados de NEPs MC2, MC5 y XRPC1 sobre *Galleria mellonella* y *Tenebrio molitor*.

## **VII.- Materiales y métodos**

### **7.1 Área de estudio**

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

La etapa de campo se realizó en parcelas dedicadas a cultivos de caña de azúcar en la localidad de real del puente del municipio de Xochitepec Morelos en las coordenadas 18.796025 - 99.241687 en donde se tomaron muestras de suelo.

La 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.

### **7.2 Colecta de las muestras**

Los muestreos se realizaron durante todo el ciclo del cultivo correspondiente a plantación de semilla- quema y corte de caña (enero 2016 a enero 2018). Se tomaron muestras de suelo sistemáticamente en cinco puntos al azar tomando aproximadamente 1 kilogramo de suelo con una pala de mano a una profundidad de 10 a 20 cm (Stock *et al.*, 1999), las muestras obtenidas de cada sitio se mezclaron uniformemente y se colocaron en una bolsa de polietileno colocando en una etiqueta los datos correspondientes al punto de muestreo, los cuales se tomaron con ayuda de un GPS.





Figura 5. Método de toma y procesamiento de muestra Stock, 1999

### 7.3 Análisis de suelo

Se realizaron análisis de suelo para conocer las características fisicoquímicas como Textura, pH, conductividad eléctrica (CE), Materia orgánica (MO)

### 7.4 Aislamiento de NEPs

Para la extracción de nemátodos entomopatógenos, se procedió a homogenizar el suelo para desmoronar cepellones compactados y eliminar rocas que pudieran dañar al insecto cebo. Los insectos cebo que se emplearon fueron: *Spodoptera frugiperda*, *Tenebrio molitor* y *Galleria mellonella* en 4° estadio larval.

El suelo de cada muestra se dividió en 3 porciones de 200g cada una, posteriormente se colocaron de manera individual en una bandeja rectangular de plástico (25X30X9 cm aproximadamente), con tapadera y con capacidad de 300g; el suelo se humedeció con agua destilada procurando que la humedad sea uniforme en todo el sustrato. Posteriormente se introdujeron 12 larvas de 4° estadio de *S. frugiperda*, *T. molitor* y *G. mellonella* en cada recipiente etiquetado con la información correspondiente de cada muestra, ya tapados los recipientes se voltearon con la finalidad de que las larvas se movilicen, lo que facilitará la

Infección por nemátodos entomopatógenos presentes en el suelo (Sturhan *et al.*, 2005); los recipientes se mantuvieron a temperatura ambiente por diez días. Transcurrido este periodo, se extrajeron las larvas que presentaron signos de infección (larvas flácidas y que se tornan de color amarillo o rojo) se examinaron con ayuda de un microscopio estereoscópico. Posteriormente se realizaron los postulados de Koch para verificar que los nemátodos sean patógenos.

Una vez que se obtuvieron estos nemátodos se realizaron trampas White (White, 1927) para la obtención de juveniles infectivos. Los juveniles infectivos se colocaron en frascos de cultivo de tejido (Corning) con un volumen de 250 ml de agua estéril destilada en condiciones de laboratorio.

### **7.5 Propagación y conservación de nemátodos**

Con la finalidad de mantener el cultivo de los diferentes aislados, estos se propagaron y conservaron de la siguiente manera. Se utilizaron cajas Petri (60x15mm) que contenían un disco de papel filtro Whatman del N° 1 humedecido con agua destilada estéril, sobre el papel se colocó una larva de *G. mellonella*, la cual se infectó colocando sobre el papel 100 µl de la suspensión de nemátodos; las soluciones contenían nemátodos en estado J1 de los aislados. Después de 14 días, las larvas se pasaron a una trampa White, para la colecta de nematodos; de cada aislado se tomaron 2 ml los cuales se depositarán en frascos para cultivo de células Corning® Flash de 50 ml, posteriormente se agregaron 23 ml con una solución isotónica de NaCl estéril al 0.75%; para su almacenamiento, los frascos se colocaron en una incubadora a una temperatura de 12±1 °C. En estas condiciones los nemátodos son viables alrededor de dos meses.

### **7.6 Material biológico:**

Los aislado MC2-2014 y MC5-2014 fueron aislados en cultivos de caña de azúcar en el 2014 y son parte de la colección de NEPs del Centro de Investigación en Biotecnología del laboratorio de control biológico.

#### **7.6.1 Aislado de NEPs MC2-2014**

Fue aislada en suelo franco arenoso con pH de 7.98 y un porcentaje de materia orgánica (M.O) de 2.02% en cultivo de caña de azúcar del estado de Morelos en las

coordenadas latitud sur 9 71 33 51 y latitud oeste 98 15 11. Se realizó la determinación de identidad con las herramientas moleculares con una cobertura máxima de 1334 pb obteniendo un 98% de identidad con *Heterorhabditoides chongmingensis*. Aislado por Castro, 2015

#### **7.6.2 Aislado de NEPs MC5-2014**

Fue aislada en suelo franco arenoso con un pH de 6.4 y un porcentaje de M.O de 2.64% en cultivo de caña de azúcar del estado de Morelos con las -coordenadas latitud sur 71 37 49 y oeste 98 25 53. Se realizó la determinación de la identidad con las herramientas moleculares con una cobertura máxima de 1218 pb obteniendo un 94% de identidad con *Oscheius myriophila*. Aislado por Castro, 2015

#### **7.6.3 Aislado XRPC1, XRPSI, XRPC2, XRPII, XRPSD, XRPID, XRPSI2**

Corresponden a los aislados de suelo en la parcela de Real del Puente en el municipio de Xochitepec Morelos de 2016 a 2018 en la tabla 6 se muestra la información completa de cada uno de los aislados.

### **7.7 Bioensayos de patogenicidad**

#### **.7.7.1 *Spodoptera frugiperda***

Se emplearon larvas de *S. frugiperda* de 3° y 4° estadio como insecto cebo para el aislamiento de nemátodos entomopatógenos, las larvas se obtendrán de la cría establecida en el Laboratorio de Control biológico (CEIB-UAEM).

#### **7.7.2 *Tenebrio molitor***

Se emplearon larvas de *T. molitor* de 3° y 4° estadio para la determinación de patogenicidad, las larvas se obtendrán de la cría establecida en el Laboratorio de Parasitología Vegetal (CEIB-UAEM).

### **7.7.3 *Galleria mellonella***

Se emplearon larvas de *G. mellonella* de 3° y 4° estadio como insecto cebo para el aislamiento de nemátodos, las larvas se obtendrán de la cría establecida en el Laboratorio de Control Biológico (CEIB-UAEM).

### **7.7.4 Cuantificación de NEPS.**

Se realizo cuantificaciones de nemátodos mediante una dilución 1:10 donde se tomo 1mL de la solución que se cuantificará bajo un microscopio estereoscópico, repitiendo el conteo cinco veces para sacar un promedio (Woodring y Kaya, 1988) de acuerdo a la formula siguiente:

$$A = D \times C / B$$

En donde:

A: Suspensión madre

B: Número de nemátodos/ml de la suspensión madre

C: Volumen final en mililitros

D: Concentración deseada

(Woodring y Kaya 1988).

### **7.7.5 Patogenicidad de nemátodos**

Se prepararon concentraciones de 10 y 50 JI. El control positivo fue agua destilada estéril. Dichas concentraciones se aplicarán en una caja Petri (60x15mm) que contenía en el fondo doble papel filtro de 90mm posteriormente se agregarán 250  $\mu$ L de agua estéril destilada y se colocará una larva de *S. frugiperda* de 3° y 4° instar. Después de 24h se retirarán de la caja inoculada y se pasarán a una caja con dieta meridica. La unida experimental consistirá en 15 cajas Petri con tres réplicas.

Se observó la mortalidad a las 48, 72, 96, 120 horas, se considera la mortalidad de la larva cuando presente apariencia flácida y cambio en la coloración además se verificó la presencia de nematodos con ayuda de un microscopio esteroscopico

## **7.8 Análisis estadístico.**

Se estableció un diseño experimental completamente al azar. Los porcentajes de mortalidad se transformarán aplicando el arco seno de la raíz cuadrada del dato obtenido, para su posterior análisis de varianza y una comparación múltiple de medias con la prueba de Tukey en un nivel de significancia de 0.05.

## **7.9 Identificación taxonómica**

### **7.9.1 Preparación de especímenes**

Se llevó a cabo en el Laboratorio de Parasitología del Centro de Investigaciones Biológicas CIB/UAEM. Los nemátodos se colocarán en cajas Petri conteniendo solución salina al 0.75% y se fijarán con formol salino al 4% caliente, este método ayudará a que el nemátodo quede completamente extendido, lo que facilita su observación en diferentes ángulos; posteriormente se realizará el aclaramiento de los nemátodos mediante la gradual evaporación del agua de la mezcla glicerina-agua destilada en la proporción gradual de 1:20, 1:15, 1:10, 1:5, 1:1 en una plancha de calentamiento (Caspeta-Mandujano 2010).

### **7.9.2 Identificación morfológica**

La morfología se estudió sobre preparaciones microscópicas temporales en glicerina. Para la observación de algunas estructuras externas e internas con ayuda de un microscopio compuesto

### **7.9.3 Identificación morfométrica**

Con ayuda de un microscopio compuesto equipado con ocular micrométrico se tomaron medidas morfométricas de machos y hembras de primera y segunda generación, así como de los juveniles infectivos extraídos con menos de una semana de haber salido de las larvas de *S. frugiperda*, de acuerdo a lo propuesto por Nguyen y Smart, 1996.

## **7.10 Identificación molecular**

Se llevó a cabo en el Laboratorio de Fisiología Molecular de Plantas del centro de investigaciones en biotecnología CEIB/UAEM. En donde los nemátodos aislados se mantuvieron en alcohol absoluto, para realizar la extracción de DNA, posteriormente se colocaron en agua inyectable con ayuda de alfileres entomológicos.

### **7.10.1 Extracción de DNA**

Se llevó a cabo en el Laboratorio de Fisiología Molecular de Plantas del centro de investigaciones en biotecnología CEIB/UAEM. En donde se utilizaron 500 juveniles infectivos que se colocaron en agua destilada, las muestras se mantuvieron congeladas hasta la extracción de DNA. Para la extracción de DNA se retiraron del agua mediante centrifugación desechando en su totalidad el líquido, al pellet de JI se agregó nitrógeno líquido, para posteriormente macerar dentro del tubo eppendorf con ayuda de un pistilo de plástico. A continuación se siguió el protocolo recomendado por el fabricante Quick-DNA Universal kit.

### **7.10.2 Técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

Se llevó a cabo la reacción de PCR donde se amplificará la región ITS y 28S que incluye la región conservada del 5.8 S, mediante los iniciadores TW 81(5'-GTTTCCGTAGGTGAACCTGC-3') AB28 (5'ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT3') D2F (5'CCTTAGTAACGGCGAGTGAAA3') y 536 (5' CAGCTATCCTGAGGAAAC3') que son empleados para la identificación de nemátodos entomopatógenos (Howlett *et al.*, 1992; Nguyen *et al.*, 2006).

El volumen final del PCR fue de 50 µl que incluyo buffer, Taq polimerasa, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, oligos, DNA. El perfil de temperaturas consistió en un primer paso de desnaturalización a 94°C durante 2 minutos, seguido 30 segundos de desnaturalización a 94°C, 45 segundos de alineamiento a 55°C, 90 segundos de extensión a 72°C y una fase de extensión final a 72°C durante 5 minutos por 37 ciclos. Para el aislado MC5 el perfil de temperatura fue diferente en donde el primer paso de desnaturalización fue de 94°C por 2 min, 94 por 30 seg, 48 por 45 seg, 72 por 90 seg y 72 por 5 min por 37 ciclos. La reacción se llevó a cabo en un termociclador de 48 pozos.

### **7.10.3 Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa**

En un gel de agarosa al 1% se colocó el producto de PCR, se cortó el fragmento correspondiente a 850pb y se purificó siguiendo el protocolo QUIEX II de la marca QIAGEN, posteriormente se cuantificó el producto mediante un espectrofotómetro Nanodrop para enviar a secuenciar de (120 – 150 ng) de DNA.

### **7.10.4 Análisis de secuencias de DNA**

Los productos de PCR purificados fueron enviados a secuenciar a la unidad de secuenciación del Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma del estado de México (IBT/UNAM). Después de obtener la secuencia, se ingresaron al programa de bioinformática BioEdit v7.0.5 para analizar y editar las secuencias biológicas y sometidas a BLAST del GenBank (National Center of Biotechnology Information).

### **7.11 Bioensayo para monitoreo de ciclo biológico del aislado XRPC4**

Se emplearon larvas de tercer estadio de *G. mellonella*. El tratamiento consistió en aplicar 10 JI por cada unidad experimental, la unidad experimental consistió en colocar 5 larvas *G. mellonella* en una caja Petri de 90X18 mm con doble papel filtro, humedecidas con 250 µL de agua estéril destilada. Los tratamientos fueron cinco a los cuales se les agrego 10 JI al testigo se le coloco agua estéril destilada, y se revisaron a los 10, 15, 20, 30 y 35 días. El bioensayo se mantuvo a 25° C.

Las larvas que presentaron signos de infección por NEPs se pasaban por un canal de desinfección que consistió en inmersiones por soluciones de: agua estéril destilada, cloro al 3% y tres pases por agua estéril por un minuto, con la finalidad de eliminar NEPs del exterior y solo conservar los que lograron introducirse en el insecto. Una vez realizado el proceso de desinfección, las larvas fueron desinfectadas sobre una caja Petri con solución de formol salino al 4% a punto de ebullición, para fijar los nemátodos, con ayuda de alfileres entomológicos se montaron en un porta objetos, al cual se le agrego una gota de glicerina 1:20 para ser aclarados por el protocolo propuesto por (Caspeta-Mandujano 2010) y observar los especímenes en microscopio.

## VIII.- Resultados y discusión

### 8.1 Identificación morfológica.

#### 8.1.2 Aislado MC2-2014 (*Heterorhabditoides chongmingensis*)

Se realizó la corroboración de identidad del aislado MC2 comparando las estructuras morfológicas internas y externas con los reportes existentes por Zhang *et al.*, 2008. Se observó la correspondencia con la especie *Heterorhabditoides chongmingensis* de acuerdo a sus características morfológicas que a continuación se describen y se muestran en las figuras 5 y 6:

#### **Descripción:**

Hembras: en forma de C, cuerpo robusto, parte anterior estrecha, seis labios prominentes, dos anfidios, papilas cefálicas separadas, estoma tubular, istmo corto, anillo nervioso localizado en la parte anterior del istmo, bulbo basal prominente, gónadas didélficas, vulva usualmente posterior de la mitad del cuerpo.

Machos: el cuerpo en la parte ventral curvado al fijarlos se observan en forma de (J), estoma tubular, faringe cilíndrica e hinchada, esófago con presencia de collar largo, istmo diferenciado; bulbo globoso en la parte basal, anillo nervioso localizado en la parte anterior del istmo, poro excretor en el bulbo basal, espículas separadas paralelamente, presencia de bursa con una disposición de los rayos de 1, 2, 3, 3.



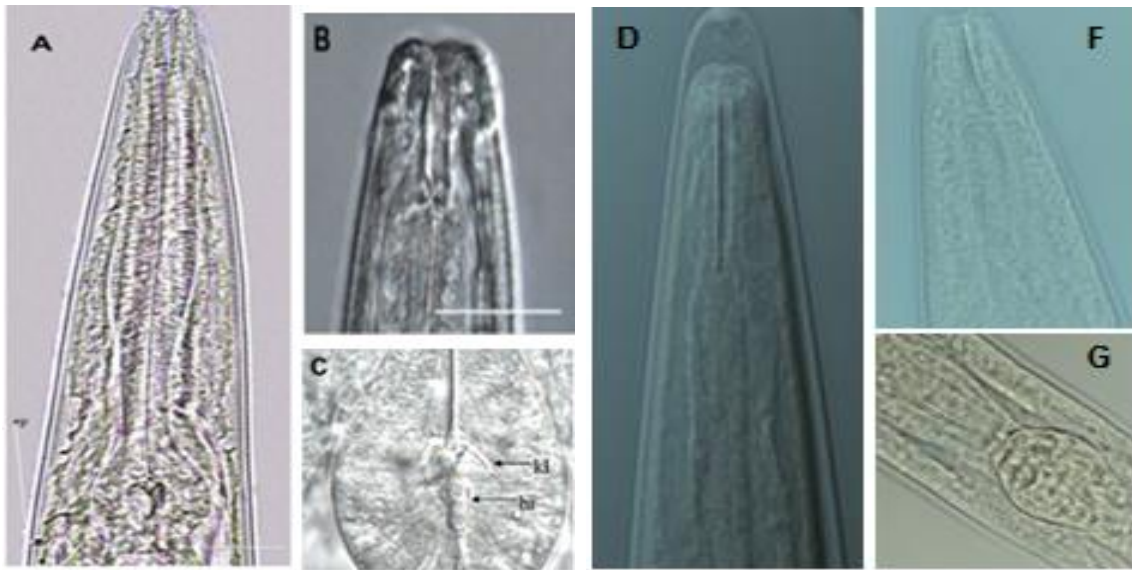


Figura 6. Parte anterior de *H. chongmingensis* A, B y C fotografías tomadas de Zhang *et al.*, 2008; D, F y G fotografías tomadas por Castro, 2016. En ambas puede observarse estoma tubular y el bulbo globoso en la parte basal.

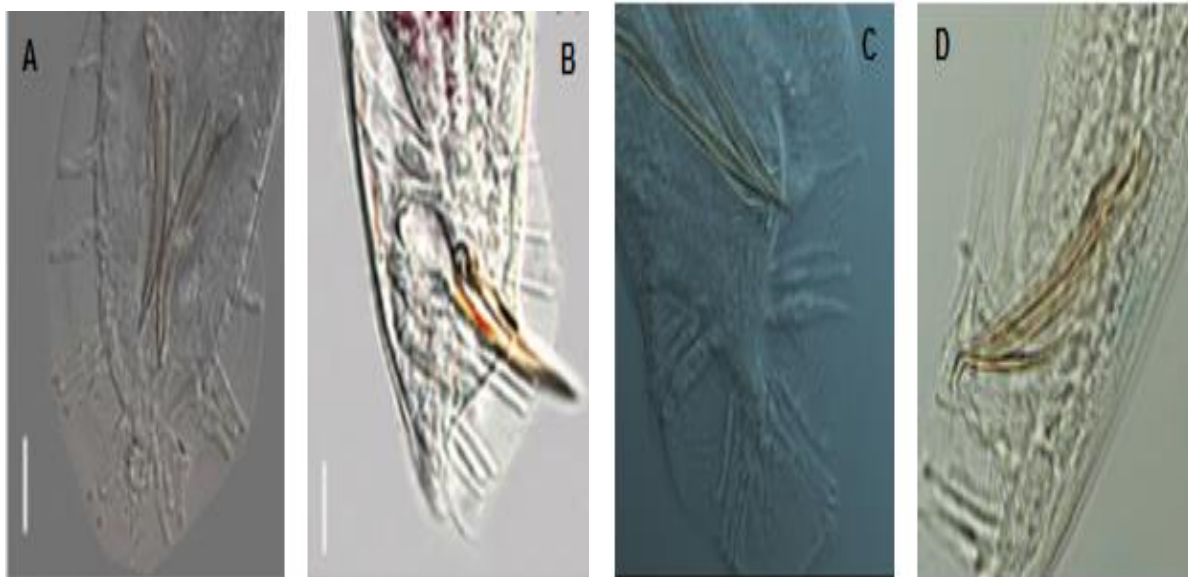


Figura 7. Parte posterior de machos de *H. chongmingensis*. A y B fotografías tomadas de Zhang *et al.*, 2008; C y D fotografías tomadas por Castro, 2016. En ambas figuras puede observarse las espículas y la disposición de los rayos en 1, 2, 3, 3.

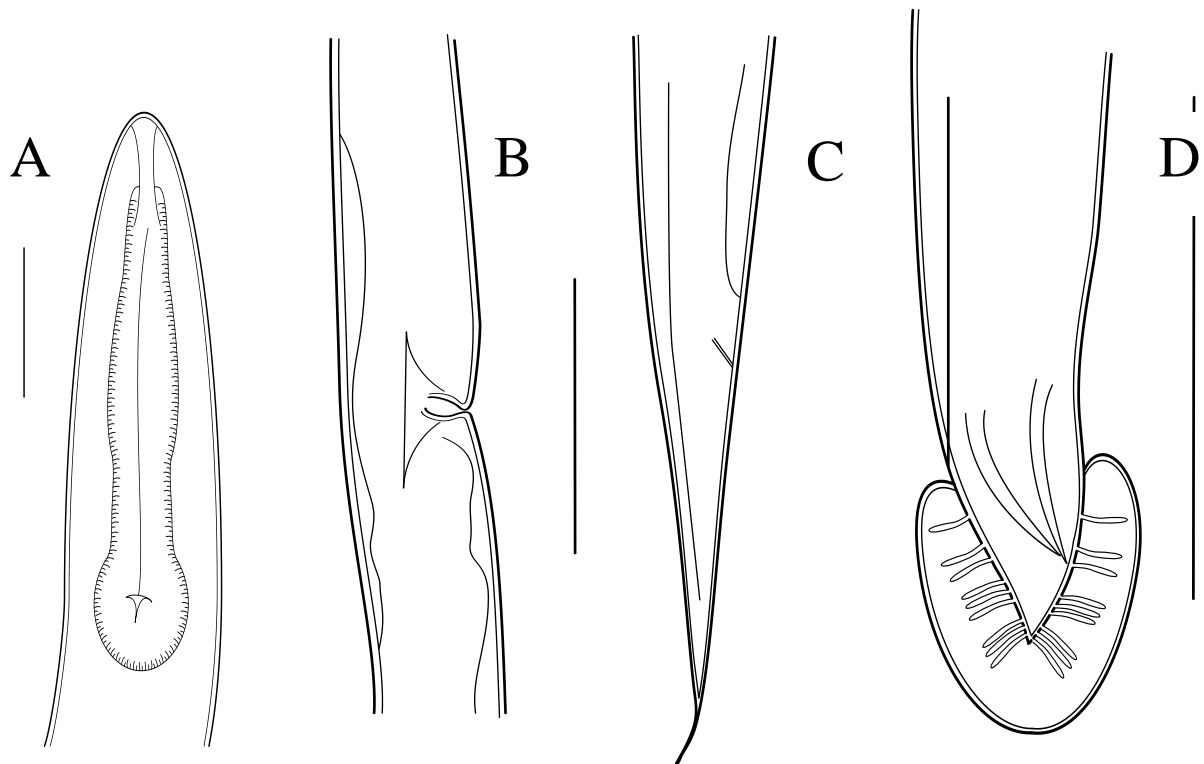


Figura 8. Dibujos *H. chongmingensis*. A) Parte anterior presencia de bulbo basal, B) hembra, vulva en la parte media, C) parte posterior hembra terminación en punta, D) macho bursado con pailas distribuidas 1, 2, 3, 3.

**Clasificación:**

**Phylum:** Nematoda

**Clase:** Secernentea

**Familia:** Rhabditidae

**Género:** *Heterorhabditoides*

**Especie:** *Heterorhabditoides chongmingensis*

**Habitad:** Suelo

**Hospedero:** Insecto cebo *Spodoptera frugiperda* y *Galleria mellonella*

**Distribución geográfica:** China y México.

### **8.1.3 Aislado MC5-2014 (*Oscheius myriophila*)**

#### **Descripción:**

Hembras. Cuerpo forma de C, nemátodos pequeños, parte anterior estrecha, faringe hinchada, presenta un bulbo basal, vulva en la parte media del cuerpo.

Machos: el cuerpo en la parte ventral ligeramente curvado, cabeza estrecha en la parte anterior, estoma tubular presenta un bulbo en la parte anterior de esófago y uno en la parte basal, espículas separadas paralelamente, presencia de bursa con una disposición de los rayos de 2, 1, 3, 2.

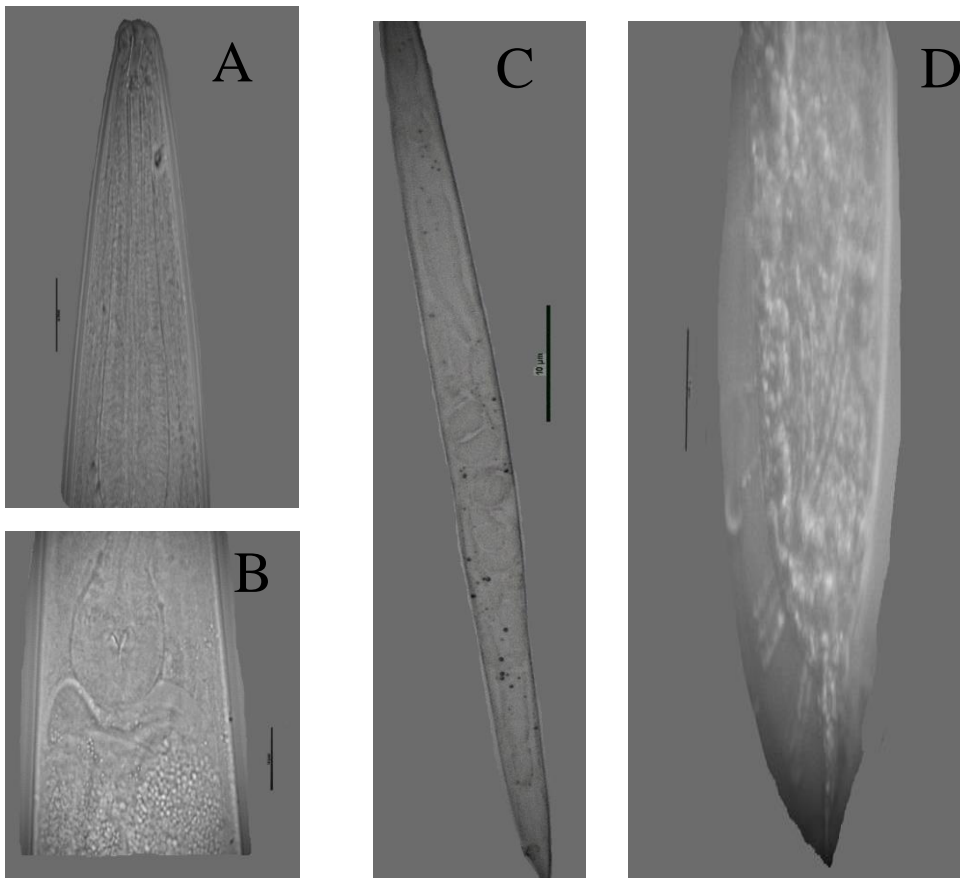


Figura 9. *Oscheius myriophila*. A) Parte anterior, B) bulbo basal, C) hembra grávida, D) macho bursado con disposición de papilas 1, 1, 3,3.

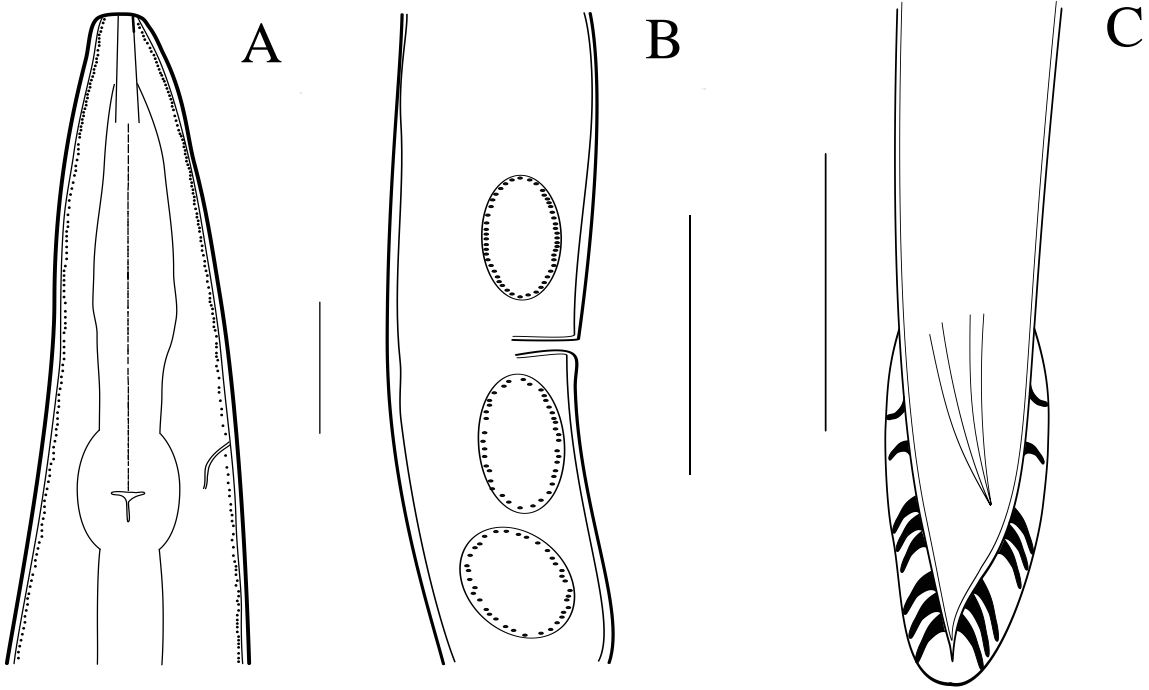


Figura 10. Dibujos *Oscheius myriophila*. A) parte anterior se observa bulbo basal y poro excretor, B) hembra con vulva en la parte media, C) macho bursado papilas dispuesta en 3,3,1,1.

**Clasificación:**

**Phylum:** Nematoda

**Clase:** Secernentea

**Familia:** Rhabditidae

**Género:** *Oscheius*

**Especie:** *Oscheius myriophila*

**Habitad:** Suelo

**Hospedero:** Insecto cebo *Spodoptera frugiperda* y *Galleria mellonella*

**Distribución geográfica:** Turquía, Francia, E.U.S.A y México. Referencia

#### **8.1.4 Identificación morfométrica**

En base a las características morfométricas de machos y hembras comúnmente utilizadas para la identificación de nemátodos, se observaron bajo microscopio compuesto 10 hembras y 10 machos de los aislados MC2 y MC5 y se realizaron mediciones morfométricas, obteniéndose tamaños máximos y mínimos de esófago, espículas, largo y ancho del cuerpo de los nemátodos, y se calculó el valor promedio, lo que permitió la corroboración con *Heterorhabditoides chongmingensis* del aislado MC2 y *Oscheius myriophila* las tablas se presentan a continuación. Los datos de morfometría y las comparaciones con los reportes existentes se muestran en los cuadros 2, 3 y 4.

Tabla 2. Morfometría del aislado MC2-214 identificado como *H. chongmingensis* (mm)

Carácter	Hembra										Macho										
<b>L</b>	0.91	1.05	1.11	0.69	0.78	0.65	<u>1.33</u>	<u>0.6</u>	1.25	0.97	0.66	<u>0.95</u>	0.92	0.88	0.83	<u>0.63</u>	0.76	0.7	0.93	0.93	
<b>W</b>	0.03	0.04	0.04	0.03	0.25	0.04	0.08	0.09	0.08	0.03	0.03	0.05	0.05	0.05	0.03	0.01	0.03	0.02	0.04	0.03	
<b>Vul</b>	0.38	0.4	0.41	0.28	0.36	0.2	0.5	0.28	0.56	0.5											
<b>Esp</b>												0.04	0.04	0.04	0.04	0.03	0.03	0.04	0.03	0.03	0.03
<b>G</b>												0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03	0.04	0.02	0.02

En donde: (L) es el largo total del cuerpo, (W) ancho máximo del cuerpo, (Vul) vulva, (Esp) espículas, (G) gubernaculum.

**Tabla 3. Comparación de morfometría de *H. chongmingensis* (mm)**

<b>Carácter</b>	<b>Hembra MC2-2014</b>	<b>Hembra Zhang <i>et al.</i>, 2008</b>	<b>Macho MC2-2014</b>	<b>Macho Zhang <i>et al.</i>, 2008</b>
<b>L</b>	(0.6 - 1.33)	(0.8 - 1.3)	(0.63-1.33)	
<b>W</b>	(0.03 - 0.25)	(0.04 - 0.06)	(0.01 – 0.05)	
<b>Vul</b>	(0.2 - 0.5)	(0.05 )		
<b>Huevos</b>				
<b>Esp</b>			(0.03-0.04)	(0.03-0.06)
<b>G</b>			(0.02-0.04)	(0.02 - 0.03)

En donde: (L) es el largo total del cuerpo, (W) ancho máximo del cuerpo, (Vul) vulva, (Esp) espículas, (G) gubernaculum.



**Tabla 4 Morfometría del aislado MC5-2014 identificado como *Oscheius myriophila* (mm)**

<b>Carácter</b>	<b>Hembra</b>								<b>Macho</b>											
<b>L</b>	0.78	0.92	1.15	0.9	1.2	1.16	<b>0.75</b>	<b>1.16</b>	0.76	0.91	0.87	<u><b>0.91</b></u>	0.92	0.9	0.88	<u><b>0.77</b></u>	0.81	0.8	0.86	0.72
<b>W</b>	0.03	0.03	0.04	0.03	0.06	0.04	0.03	0.05	0.03	0.03	0.02	0.02	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
<b>Vul</b>	0.56	0.5	0.5	0.53	0.62	0.55	0.76	0.7	0.41	0.41										
<b>Huevos</b>			0.05		0.05				0.56											
<b>Esp</b>											0.04	0.08	0.03	0.04	0.04	0.04	0.03	0.04	0.04	0.03
<b>G</b>											0.02	0.03	0.02	0.03	0.02	0.03	0.03	0.04	0.02	0.02

En donde: (L) es el largo total del cuerpo, (W) ancho máximo del cuerpo, (Vul) vulva, (Esp) espículas, (G) gubernaculum

**Tabla 5. Comparación de morfometría *Oscheius myriophila* ( $\mu\text{m}$ )**

	<i>Oscheius myriophila</i> Tabassum et al., 2016	<i>Oscheius myriophila</i> MC5-2014	<i>Rhabditis myriophila</i> Poinar, 1986
Tipo de Localidad		México	California
Tipo de hospedero /habitat		Suelo, caña de azúcar	<i>Oxisdis gracilis</i>
<u>Hembra</u>			
L	972-1530	760-1160	
W	52-100	30-60	
EP		97-120	
V		410-760	
Huevo		50-56	
<u>Macho</u>			
L	841-1175	720-910	830-1470
W	52-72	20-30	380-800
Ep		97-100	
Espícula	27-39	30-80	

---

En donde: (L) es el largo total del cuerpo, (W) ancho máximo del cuerpo, (Vul) vulva, (Esp) espículas.

## 8.2 Identificación molecular

Los fragmentos que se lograron amplificar de la región ITS tienen un tamaño de 850 pb, este tamaño es similar a los reportes existentes en cuanto al tamaño de la región ITS en NEPs (Spiridonov *et al.*, 2004). Los resultados de amplificación se muestran en la Figura 10.

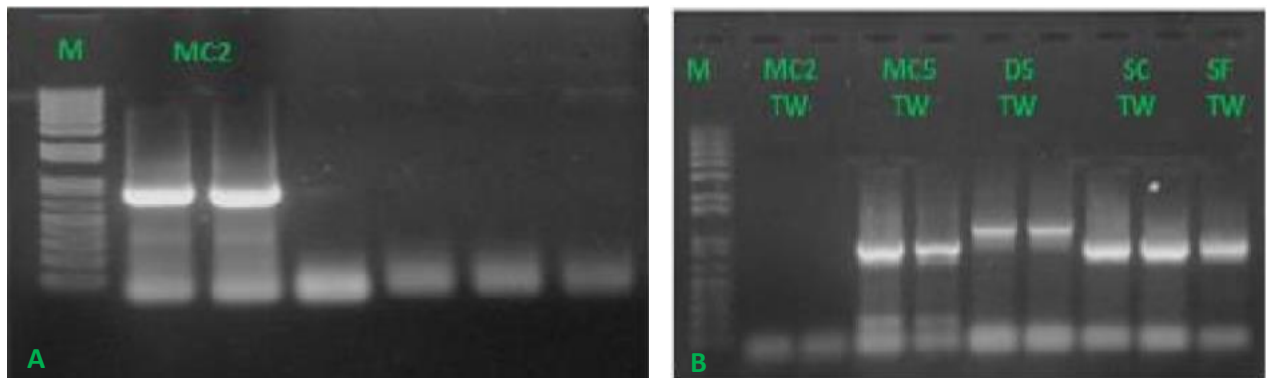
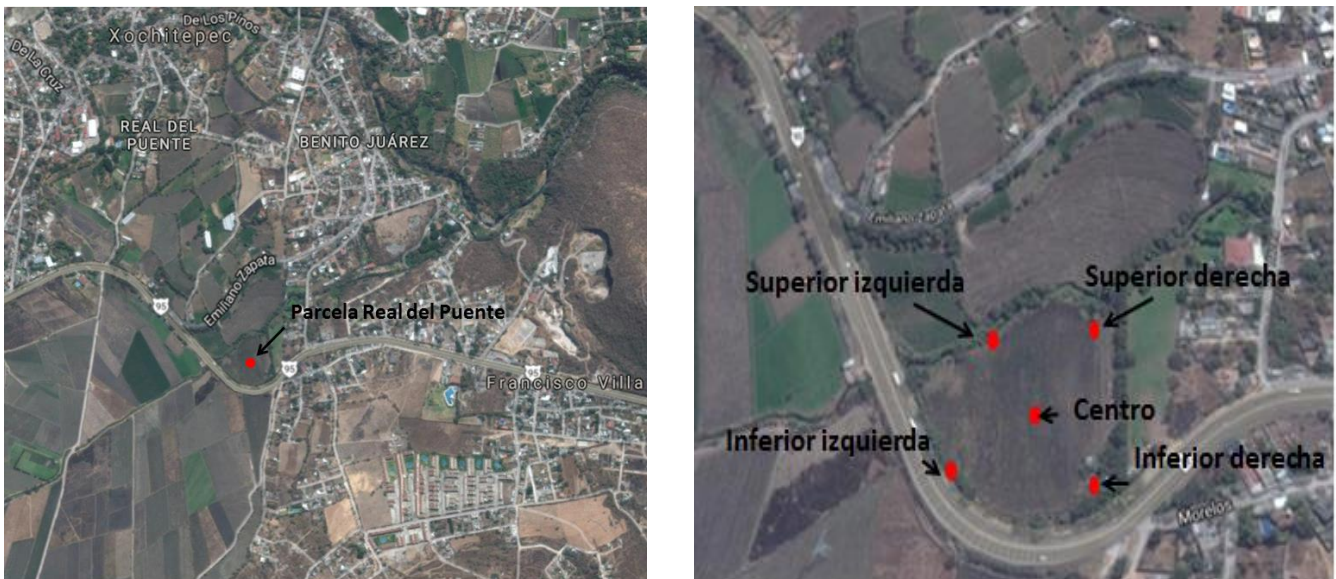


Figura 11. Amplificación de los aislados MC2 y MC5 en gel de agarosa 1%. A) El primer carril corresponde al marcador molecular de 1Kb plus, en carril 3 y 4 amplificación del fragmento de interés correspondiente al aislado MC2. B) El primer carril corresponde al marcador 1Kb plus, en los siguientes carriles se pueden observar los fragmentos amplificados del aislado MC5 fragmento de interés y los siguientes carriles corresponden a los NEPs comerciales *S. carpocapsae* (SC), *S. feltiae* (SF) con los oligos TW y 28S.

Los productos de PCR purificados fueron enviados a secuenciar a la unidad de secuenciación del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBT/UNAM). Después de obtener la secuencia, se ingresaron al programa de bioinformática BioEdit v7.0.5 para analizar y editar las secuencias biológicas y posteriormente se realizó un BLAST y se compararon con las secuencias de la base de datos del GenBank.

### 8.3 Aislamiento de NEPs en cultivos de caña de azúcar en sus diferentes etapas fenológicas.

Los muestreos se realizaron en la parcela de Real del Puente del municipio de Xochitepec, Morelos en las coordenadas 18.796025 - 99.241687, durante dos ciclos de cultivo correspondiente a plantación de semilla, quema y corte de caña (enero 2016 a febrero 2018). En la figura 12? puede observarse las fotografías satelitales del área de



estudio.

Figura12. Imagen satelital del área de estudio en el municipio de Xochitepec Morelos.

A los aislados se les asignó la nomenclatura de acuerdo al lugar de aislamiento:

**XRPSI:** Muestra correspondiente a la parte superior izquierda.

**XRPC:** Muestra correspondiente a la parte del centro.

**XRPII:** Muestra correspondiente a la parte inferior izquierda.

**XRPSD:** Muestra correspondiente a la parte superior derecha.

**XRPID:** Muestra correspondiente a la parte inferior derecha

Los resultados positivos (donde se lograron aislar NEPs )se muestran en la Tabla .

Cuadro 6. Datos de aislamiento de NEPs en Real del puente Xochitepec, Morelos en las coordenadas (18.796025 99.241687). Tabla 6 Aislamiento positivos en Xochitepec.

<b>Aislado</b>	<b>Fecha</b>	<b>Hospedero</b>
XRPC1	Enero2016	<i>Tenebrio molitor</i> (3 Larva)
XRPSI	Julio 2016	<i>Tenebrio molitor</i> (3 larvas y 2 pupas)
XRPC2	Julio 2016	<i>Tenebrio molitor</i> (2 pupas)
XRPII	Julio 2016	<i>Tenebrio molitor</i> (2 larvas y 3 pupas)
XRPSD	Julio 2016	<i>Tenebrio molitor</i> (3 larvas)
XRPID	Julio 2016	<i>Tenebrio molitor</i> (4 larvas y 1 pupa)
XRPC3	Junio 2017	<i>Tenebrio molitor</i> (1 Larva) <i>Galleria mellonella</i> (2 larvas)
XRPSI2	Junio 2017	<i>Tenebrio molitor</i> (1 larva)
XRPII2	Junio 2017	<i>Tenebrio molitor</i> (8 larvas)
XRPID2	Junio 2017	<i>Tenebrio molitor</i> (1 larva)
XRPSD2	Junio 2017	<i>Tenebrio molitor</i> (3 larva)
XRPII2	Julio 2017	<i>Galleria mellonella</i> (6 pupas)
XRPC4	Febrero 2018	<i>Galleria mellonella</i> (3 larvas)

## 8.4 Monitoreo de ciclo biológico del aislado XRPC4

Se lograron obtener especímenes machos a los 20 días a una temperatura de 25°C, a partir del día 20 hasta el día 35 se siguieron teniendo especímenes machos, cabe resaltar que el porcentaje de ejemplares machos es menor que la de las hembras.

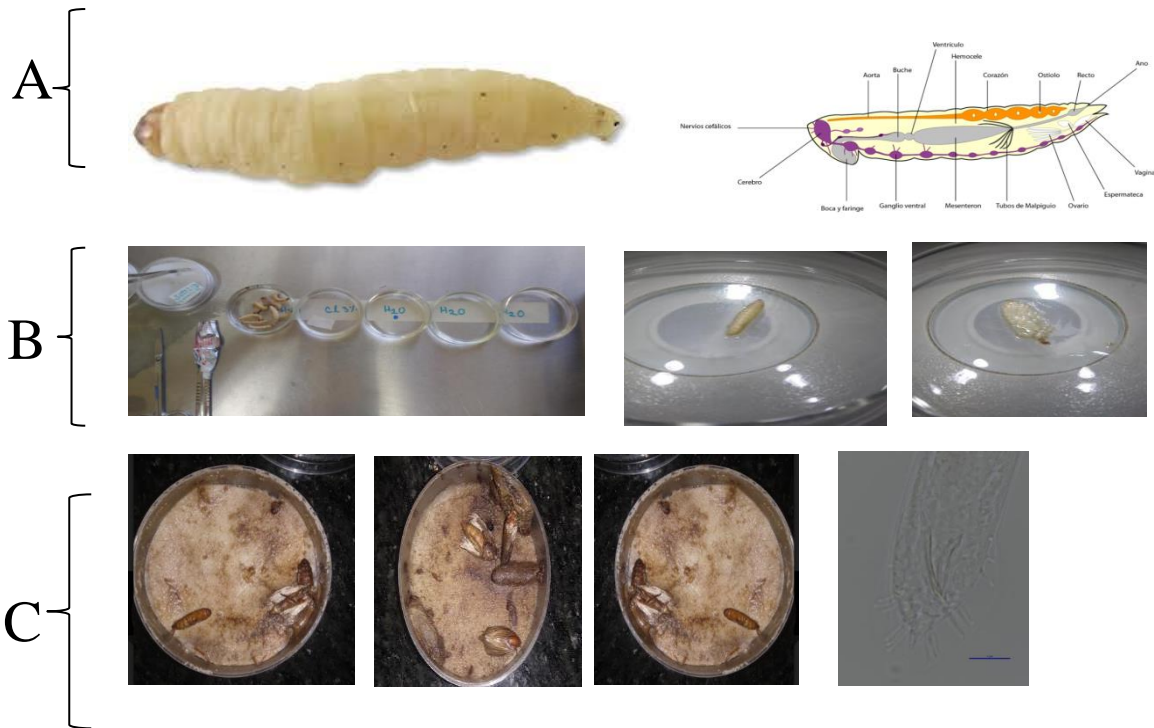


Figura 13. Bioensayo de monitoreo del ciclo biológico. A) larvas de *Galleria mellonella*, B) fotografía de desinfección de larvas de *Galleria mellonella* y disección, C) Presencia de especímenes machos a los 20 d.

## **8.5 Identificación morfológica aislado XRPC4**

### **Descripción**

Hembras: Cuerpo robusto, parte anterior estrecha, esófago hinchado, istmo corto, presencia de bulbo basal. faringe hinchada con presencia de bulbo basal, vulva en la parte media del cuerpo, cauda con terminación punta.

Machos: Con con cuerpo robusto y parte anterior similar al de las hembras, machos bursados con papilas dispuestas en 1,1,1,3,3. Presentan una espícula ligeramente mas grande una de otra.

## **8.6 Identificación morfométrica**

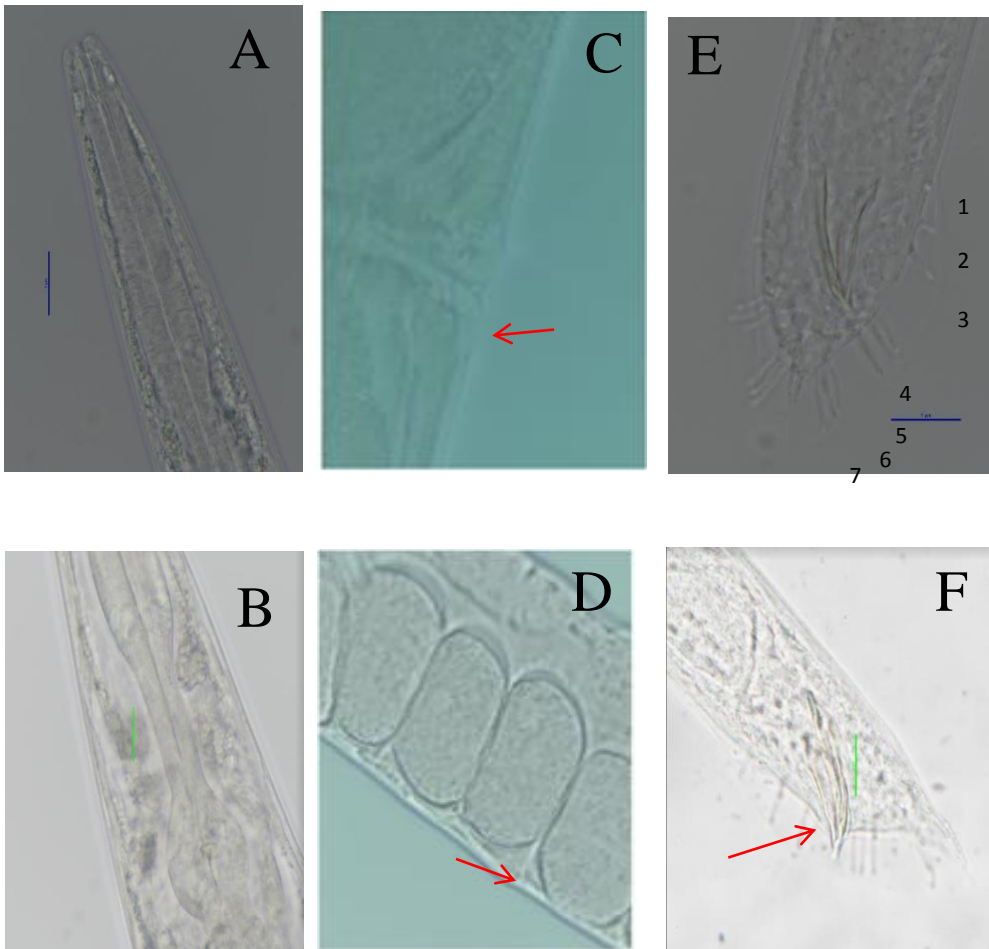
Basándose en las características morfométricas de machos y hembras empleadas para la identificación de nemátodos, se observaron bajo microscopio compuesto articulado con ocular micrométrico 10 hembras y 10 machos del aislados XRPC1. Se realizaron mediciones morfométricas, obteniéndose valores en hembras de [L(argo máximo) 0.76-1.38 en machos de 0.75-1.09] mínimos y maximos de esófago, espículas, largo y ancho del cuerpo de los nemátodos, y se calculó el valor promedio. Los datos de morfometría se muestran en el Cuadro 7

Tabla 8. Morfometría XRPC4

Carácter	Cepa XRPC4
N	10
Tipo de localidad	Morelos, México
Tipo de hospedero/hábitat	Suelo, caña de azúcar
<u>Hembra</u>	
L	<u>0.76-1.38</u>
W	0.01-0.08
EP	0.12-0.19
V	0.48-0.56
Huevos	0.05-0.06
<u>Macho</u>	
L	<u>0.75-1.09</u>
W	0.04-0.08
Ep	0.15-0.16
Espículas excretor.	0.03-0.05

En donde: N: numero de ejemplares, L: largo total, W: ancho maximo, V: vulva, Ep: poro





9<sup>8</sup>

Figura 14. Morfología interna aislado XRPC4. A) parte anterior, B) bulbo basal, C) vulva parte media, D) Hembra grávida, E) macho bursado con papilas en disposición 1,1,1,3,3, F) espículas

**.Clasificación:**

**Phylum:** Nematoda

**Clase:** Secernentea

**Familia:** Rhabditidae

**Género:** *Heterorhabditoides*

**Especie:** *Heterorhabditoides* sp

**Habitad:** Suelo

**Hospedero:** Insecto cebo *Galleria mellonella*

**Distribución geográfica:** México.

### 8.8 Identificación molecular del aislado XRPC4

Los fragmentos que se lograron amplificar de la región ITS tienen un tamaño de 850 pb, este tamaño es similar a los reportes existentes en cuanto al tamaño de la región ITS en NEPs (Spiridonov *et al.*, 2004). Los resultados de amplificación se muestran en la Figura 12.

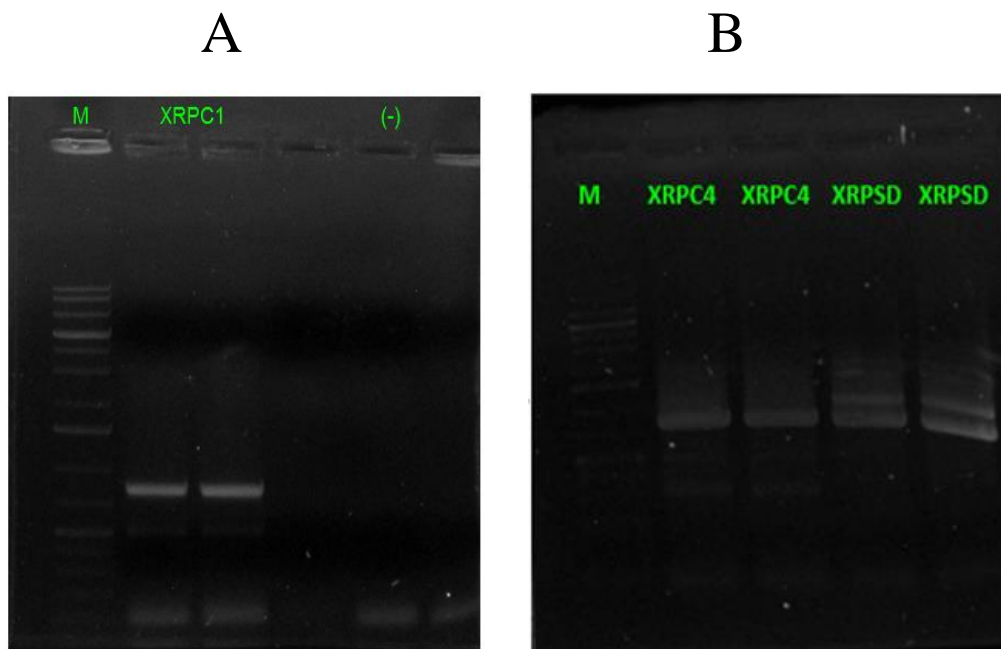


Figura 15. Amplificación del fragmento esperado. A) Producto de PCR amplificación del aislado XRPC1, B) Amplificación de los aislados XRPC4 y XRPSD.

Los productos de PCR fueron purificados y enviados a secuenciar en la unidad de secuenciación del Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma del estado de

México (IBT/UNAM). Una vez obtenida la secuencia se ingresó al programa de bioinformática BioEdit v7.0.5 para analizar y editar las secuencias biológicas y posteriormente se realizó un BLAST y se compararon con las secuencias de la base de datos del GenBank. Obteniendo los siguientes resultados que se observan en la tabla 8.

Tabla 9. Relación de especies de nemátodos del Gen Bank

Especie	Cobertura total	% de cobertura	% de identidad	Numero de acceso
<i>Heterorhabditoides</i> sp.	1445	98	99	LN611142
<i>Oscheius</i> sp	1443	97	99	MF59957

Analizando los resultados moleculares obtenidos se encontró un porcentaje de similitud del 99% con *Heterorhabditoides* sp. LN611142 y *Oscheius* sp. MF59957 con nuestro aislado XRPC4, cabe hacer mención que en base de datos se consideran sinónimos especies. El reporte de la secuencia molecular menciona que es un nemátodo sin embargo no se ha descrito taxonómicamente ni se reporta la bacteria simbiote, *Heterorhabditoides* sp. LN611142 fue aislado en costas del Líbano en 2015, mientras *Oscheius* sp. MF59957 fue aislado en 2017 en Telangana, India. En la investigación realizada por Torrini *et al.*, 2015 reportaron a una nueva especie de nemátodo entomopatígeno del genero *Oscheius*, empleando al igual que nosotros la región ITS y D2D3. En dicho estudio encontró un porcentaje de similitud con la región ITS 99%, *Oscheius* JU176 y 82% *Oscheius tipulae*. Mientras que con la región D2D3 obtuvo los siguientes porcentajes de similitud: 98% *O. tipulae*, 86% *O. guentheri* y 84% *O. myriophila*. Reportando *O. onirici* como una nueva especie de NEPs y con 1% de diferencia en la región ITS y 2% en la región D2D3. Estos trabajos así como los datos generados en nuestra investigación nos ayudan a realizar un diagnóstico de la especies, por lo que de acuerdo a las características morfológicas podemos mencionar que nuestro aislado corresponde al orden Rhabditida y que tiene las características del

género *Oscheius* al presentar un cuerpo faríngeo hinchado, istmo corto y la presenta un bulbo basal, así como descartar que sea cualquiera de las especies *O. tipulae*, *O. guentheri*, *O. onirici*, *O. myriophila*, ya que al comparar nuestros ejemplares machos con las otras especies, no presentan las características que ayudan a determinar a nivel de especie (distribución de las papilas en la parte posterior). Se debe tomar en cuenta que en el género *Oscheius* cuenta con especies con potencial para ser empleadas como NEPs (Andrassy, 1976; Sudhaus y Hooper, 1994; Pervez *et al.*, 2013).

### 8.8 Resultados de patogenicidad y virulencia de la cepa XRPC4

Se determinó la patogenicidad de la cepa XRPC4 sobre *Galleria mellonella* y *Tenebrio molitor* con dos concentraciones de 10 y 50 JI.

En el caso de *G. mellonella* con 10 JI se obtuvo el 62% de mortalidad y con la concentración de 50 JI de 79%.

Los resultados en *T. molitor* fueron con la concentración de 10 JI de 8% y con la concentración de 50JI de 75%.

Los resultados de la determinación de CL<sub>50</sub> se describen en la tabla 10 a continuación.

Tabla 10. Evaluación de virulencia cepa XRPC4

Tratamiento	CL50	Limite 0.99	
		Inferior	Superior
XRPC4	12 JI	3.9	17.5

## **IX.-Conclusiones.**

Con ayuda de las técnicas taxonómicas y moleculares nuestros aislados MC2 y MC5 tuvieron identidad con *H. chongmingensis* y *O. myriophila* respectivamente.

Se obtuvieron resultados positivos en los aislamientos en de nemátodos entomopatógenos en Xochitepec, Morelos con un total de 13 aislados, que presentan características morfológicas y moleculares semejantes por lo que pueda tratarse de la misma especie.

La cepa XRPC4 se describió taxonómica y molecularmente, se cuenta en el NCBI con el reporte de la secuencia, no obstante aún no existe reporte de esta especie por lo que esta investigación sería el primer reporte de su descripción taxonómica.

Se realizó la publicación en la revista *Nematology* de la cepa MC5-2014 *O. myriophila*, que se anexa a continuación

## Anexo I

### ***Oscheius myriophila* (Nematoda: Rhabditida) isolated in sugar cane soils in Mexico with potential to be used as entomopathogenic nematode**

Iveth del Rocio Castro-Ortega<sup>a</sup>, Juan Manuel Caspeta-Mandujano<sup>d</sup>, Ramón Suárez-Rodríguez<sup>b</sup>, Guadalupe Peña-Chora<sup>c</sup>, José Augusto Ramírez-Trujillo<sup>b</sup>, Karina Cruz-Pérez, Iván Arenas Sosa<sup>e</sup>, Víctor Manuel Hernández-Velázquez<sup>a</sup>

*Universidad Autónoma del Estado de Morelos, <sup>a</sup>Laboratorio de Control Biológico, Centro de Investigación en Biotecnología; <sup>b</sup>Laboratorio de Fisiología Molecular de Plantas, Centro de Investigación en Biotecnología; <sup>c</sup>Laboratorio de Parasitología Vegetal, Centro de Investigaciones Biológicas; Laboratorio de Parasitología Animal, Facultad de Ciencias Biológicas <sup>d</sup>, Av. Universidad No. 1001, Col. Chamilpa, Cuernavaca C.P. 6220, Morelos, México. <sup>e</sup>Universidad Nacional Autónoma de México Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del IBT-UNAM. Av. Universidad 2001, Chamilpa, 62210 Cuernavaca, Morelos*

\* Author for correspondence: [vmanuel@uaem.mx](mailto:vmanuel@uaem.mx)

## SUMMARY

A survey of entomopathogenic nematodes was conducted in sugar cane crops in a total of 14 soils, and positive results were obtained for strain MC5-2014 in the municipality of Tepalcingo, Morelos, in soil with a sandy loam texture and a pH of 6.4. Species determination was performed via morphological and morphometric techniques by searching for a tubular stoma with a swollen cylindrical pharyngeal body and a metacarpus in the basal part. The range of body length (L) was 750-1200  $\mu\text{m}$  in females and 720-910  $\mu\text{m}$  in males, while the corresponding maximum widths (W) of the body were 30-60  $\mu\text{m}$  and 20-30  $\mu\text{m}$ , respectively. Males exhibited bursa with a 1+1+3+3 distribution of papillae, and females exhibited a vulva located at the mid-body. For molecular identification, the ITS region of ribosomal DNA was used. Virulence tests ( $\text{LC}_{50}$ ) were conducted with *Galleria mellonella*, and a value of 4.732 was obtained for infective juveniles (IJs). Taking taxonomic and molecular characteristics into account, the isolate was determined to be *Oscheius myriophila*. The isolation of this strain represents the first geographic report of

*O. myriophila* in Mexico, and it should be noted that the cultivation of sugar cane occurs with constant application of insecticides, herbicides, fungicides, and fertilizers as well as harvesting activities such as burning of the crop for harvest. The *O. myriophila* isolate has the potential to be used in the future as a method of biological control in our country.

Key words: *Oscheius myriophila*, México, first report, virulence, sugar cane.

Entomopathogenic nematodes (EPNs) exhibit a cosmopolitan distribution and have been isolated on five continents in different habitats around the world (Griffin et al., 1990; Hominicket al., 1996). In Mexico, EPNs, particularly species of the genera *Steinernema* and *Heterorhabditis*, have been isolated in the desert, forests and arable areas (Lezama et al., 2001;-Stock et al., 2009). Worldwide, the main studies and reported isolates have come from these genera. Recently, two new species of EPNs of the genus *Oscheius* have been reported: *Oscheius chongmingensis* and *O. carolinensis*, which are associated with the pathogenic bacteria of insects of the genus *Serratia* (Nguyen and Hunt, 2007; Abebe et al., 2010). The genus *Oscheius* was described as a sister taxon of *Rhabditis* (Dujardin, 1845) Shudhaus (1976). The genus *Oscheius* belongs to the Rhabditidae family and is divided into two groups: insectivora and dolichura. The species *O. carolinensis*, *O. amsactae*, *O. niazii* and *O. siddiqii* of the insectivora group and one species of the dolichura group, *O. onirici*, have been recognized as entomopathogenic nematodes (Tabassum and Shahina, 2010; Ye et al., 2010; Torrini et al., 2015). In 2017, it was reported that *O. myriophila* was associated with the European mole cricket, *Gryllotalpa gryllotalpa* (Orthoptera: Gryllotalpidae) (Zeynep et al., 2017). The objective of the present study was to isolate entomopathogenic nematodes in sugarcane crops, and strain MC5-2014 was obtained, after which the *Serratia* bacterial strain was also isolated. This work provides the first geographic report of *Oscheius myriophila* in Mexico and the first global report of its entomopathogenic nature.

## **MATERIALS AND METHODS**

### ***1.1 Collection of soil samples***

Soil samples were collected from 14 plots of sugar cane located in the state of Tepalcingo, Morelos in Mexico using the technique proposed by Stock et al., 1999, and a modified method described by Orozco et al., 2014. For soil sample collection, within a plot, samples were taken at

five points, with three subsamples per site; for sampling, a grid of 3 m<sup>2</sup> was established around the sugar cane plant, and 1 kg of soil was collected at a depth of approximately 15 cm; the soil samples were placed in plastic bags. The sites were sampled in September 2014.

Soil analysis was performed to determine soil physicochemical characteristics such as texture, pH, electrical conductivity, and % organic matter (MO) in the bioremediation laboratory of CEIB/UAEM. EPNs were extracted with the insect baiting technique as described by Orozco in 2014. Each soil sample was baited by placing 12 fifth-instar *Galleria mellonella* Linnaeus (Lepidoptera: Pyralidae) wax worms in speech boxes containing sampled soil, and they were stored at room temperature in the dark for a week. Subsequently, the boxes were checked daily until the wax worms began to show signs of infection, at which time the insects were removed from the boxes, rinsed with water and stored in modified white traps (Orozco et al., 2014) until the EPNs emerged. After emergence, the EPNs were collected and stored in 50 mL Corning® cell culture flasks at 12 °C.

## ***1.2 Nematode identification***

### ***1.2.1 Morphological and morphometric characterization***

Morphological and morphometric identification was performed using an optical microscope equipped with a micrometric eyepiece. The nematodes were extracted through the dissection of wax worm larvae, and the IJs were collected from the white trap according to the method proposed by Nguyen and Smart (1996).

### ***1.2.3 Molecular characterization of nematodes***

For identification with molecular techniques, three hundred IJs were frozen in liquid nitrogen and macerated with a plastic pestle. Their DNA was purified with a Puregene® DNA Purification Kit following the manufacturer's instructions. An 850 bp fragment corresponding to the D2D3 region of the 23S rDNA gene was PCR amplified with the primers pair D2F (5' CCTTAGTAACGGCGAGTGAAA-3') and 536 (5' -CAGCTATCCTGAGGGAAAC-3') (Nguyen et al., 2006). The reaction was conducted in a final volume of 50 µl containing each primer at 0.5 µM, 0.16 mM dNTPs, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 units of Taq DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific Inc.) and 1X reaction buffer. The PCR product was verified by electrophoresis



in a 1% agarose gel, and the bands were excised and purified using a QIAquick® Gel Extraction kit (QIAGEN, Germany). The PCR conditions were 94 °C for 2 min initial denaturation; 37 cycles of 30 s of denaturation at 94 °C, 45 s of hybridization at 48 °C and extension at 72 °C for 90 s; with a final extension of 72 °C for 5 min. The PCR product was sent to the Biotechnology Institute of the National Autonomous University of Mexico for sequencing. The D2D3 region was analyzed using the BLAST program of the GenBank database of the National Institutes of Health.

### ***1.3.1 Isolation and identification of the bacterial symbiont***

For the extraction of symbiotic bacteria from MC5-2014, two methods were used. In the first method, 5000 freshly emerged IJs were obtained from the white trap, and were placed in Eppendorf tubes. The tubes were centrifuged at 1,000 revolutions per minute (rpm) for 7 min, and the supernatant was discarded. Thereafter, washes were conducted with 5% sodium hypochlorite, and three washes were performed with sterile distilled water (Lee and Stock, 2010). The IJ nematodes were macerated in a mortar and pestle for a period of 30 min and plated in solid Luria-Bertani (LB) and HCT (Bacto Tryptone (Difco) 5; Casamino acids (Difco) 2; pH adjusted to 7.5) media. After sterilization, culture medium consisting of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3.4 g/L;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.012 g/L;  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.003 g/L;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.0028 g/L;  $\text{Fe}(\text{SO}_4) \cdot 3.7\text{H}_2\text{O}$ , 0.02 g/L;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.147 g/L; and glucose, 3 g/L was used. For the second method of extraction from hemolymph, 10 larvae of *G. mellonella* at the 5th instar were infected with 10 IJs from a stock solution of MC5-2014 nematodes. After 96 hours, larvae with characteristics corresponding to death caused by EPNs were selected, and the outer parts of the larvae were disinfected with 70% alcohol for 10 min, followed by drying for 2 min inside a laminar flow hood (Woodring and Kaya, 1988).

Subsequently, a 0,3 ml insulin syringe with a 31 x 6 mm needle were used to extract the hemolymph by inserting the needle between the 6th and 7th inter-segments of the larvae. An aliquot of the hemolymph was plated on solid LB and HCT culture media, and the plates were incubated for 24 hours at 27 °C. All colonies were sampled, and the cross-streak technique was used to obtain single colonies. The bacteria were identified by biochemical methods using Gram staining, motility tests, and assays of protease activity and lecithinase and antibiotic production as

suggested by Boemare et al., 1997, and Akhurst, 1980. For molecular identification of the isolated bacteria, the cells were incubated in LB liquid medium for 12 hours at 30 °C, and DNA extraction was then carried out with the Easy-DNA™ kit following the instructions recommended by the manufacturer. Then, amplification of a partial 16S rRNA region (600 bp) was performed by PCR using the primer 63f (5'-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3') (Nübel et al., 1996). The PCR conditions were 95 °C for 3 min initial denaturation; 37 cycles of 35 s of denaturation at 95 °C, 42 s of hybridization at 59 °C and extension at 72 °C for 1 min 30 s; with a final extension of 72 °C for 5 min. The PCR products were identified at the Biotechnology Institute of the National Autonomous University of Mexico with the primer 63f. The sequences were analyzed using the BLAST program of the GenBank database, National Institutes of Health.

### ***1.3.2 Pathogenicity of the symbiont bacterium in *Galleria mellonella****

Pathogenicity bioassays of bacterial strain MC5-2014 were carried out in 10 larvae of the 5<sup>th</sup> stage of *Galleria mellonella*, and the treatments were carried out in triplicate. The bacterial isolates were cultured in solid LB medium for 18 hours at 27 ± 2 °C. The surfaces of the larvae were previously disinfected with 70% ethanol and inoculated by injection using 10 µl of the bacterial suspension at a concentration of 1x 10<sup>5</sup> cells. The bacterial concentration was obtained via volumetric quantification using a Neubauer chamber.

Strain Bar 86 of *S. marcescens* was used as a positive control, while the *Escherichia coli* ATCC strain and distilled water were used as negative controls. The injected larvae were placed in 60 x 15 mm Petri dishes with a meridian diet (bee honey 97.5 ml, glycerol 120 ml, wheat bran (sterile) 37.5 ml, rice cereal 300 g, yeast 75 g). The pathogenicity and the changes in the coloration of the cuticle were evaluated at 24 and 48 hours. The results were subjected to analysis of variance (ANOVA) and the Tukey test at the 0.05 probability. The SAS statistical package was applied.

### ***1.3.3 Virulence of the bacteria***

The virulence bioassays of the bacteria isolated from the MC5-2014 strain were performed on 30 larvae of *G. mellonella* in the 5th instar, and the treatment was carried out in triplicate. Bacterial strains were cultured in solid LB medium for 18 hours at 28 ± 2 °C prior to quantification with the help of a Neubauer camera; volumetric calculations were

performed and verified, and four concentrations were used to determine virulence for *G. mellonella* ( $10^5$ ,  $10^3$ , 50 and 5 cells). The surfaces of the larvae were previously disinfected with 70% ethanol. The same positive and negative controls mentioned above were used. The larvae were placed in 60 x 15 mm Petri dishes with sterile filter paper with a meridian diet for *G. mellonella*. The percentage of mortality and the change in the coloration of the cuticle were evaluated at 24 and 48 hours. Virulence ( $LC_{50}$ ) was determined by PROBIT analysis using the POLO PLUS version 1.0 program (LeORa Software LLC)

#### ***1.4.1 Virulence of entomopathogenic nematodes***

Virulence was determined using 6, 10, 14, 18 or 20 infected juveniles (IJs) plus the control, which contained only sterile distilled water. Virulence was determined by obtaining the average lethal concentration ( $LC_{50}$ ) via PROBIT analysis using the POLO PLUS version 1.0 program (LeOra Software LLC)

## **2. RESULTS AND DISCUSSION**

### ***2.1 Isolation of EPN in sugar cane soils***

Among the 14 soil samples taken from different locations in the state of Morelos, Mexico, positive results were found in the municipality of Teplacingo, which has an altitude of 1100 mm, a warm subhumid climate, an average annual temperature of 24 °C and a minimum temperature of 14 °C, from a site with sandy loam soil with a pH of 6.4 and an organic material (OM) percentage of 2.64%. We obtained the MC5-2014 isolate from sugar cane crops, and there have been reports of positive isolation in sugar cane cultures of *O. maqbooli* and *O. sacchari*. in Pakistan (Tabassum and Shahina, 2002; Tabassum et al., 2016). Our MC5-2014 isolate provides an additional isolate of nematodes belonging to the genus *Oscheius* from sugar cane, but it is the first member of this genus to be identified in Mexico.

### ***2.2 Nematode identification through morphological and morphometric characterization***

#### ***Description:***

***Female:*** Small-sized nematodes. Slender body 760-1160  $\mu$ m long slightly curved ventrally after fixation. Cuticles are finely annulated with fine longitudinal striations. The head is continuous

with the body contour, with six separate well-developed lips. Pore-like amphids on the lateral lips. Cylindrical pharyngeal body with cheilorhabdions that are not notable. The median bulb was absent. The metacarpus is swollen and pharyngeal. The isthmus is distinct, cylindrical, and slightly narrow. Nerve rings usually surround the mid portion of the isthmus. Excretory pores are conspicuously located at the level of the basal bulb. The excretion duct is circularized and curved anteriorly, then posteriorly. Vulva near the mid body and lips protruding.

*Male:* Similar to the female in general morphology except for a smaller size of 720-910  $\mu\text{m}$  in length. The body is straight after fixation. Spicules are paired, separate, symmetrical, and slightly curved ventrally with hooked tips. Head of the spicules with a rounded anterior end, lamina expanded in their proximal part and velum prominent. Bursa leptoderan and eight genital papillae (rays) of different lengths are with a 1+1+3+3 arrangement. There were 3 precloacal papillae and 6 postcloacal papillae. Papillae 8 and 7 form 6 groups, and pairs 5, 4, and 3 form the second postcloacal group. Papillae two and one are separated near the base or back of the spicules. The spicules are paired and separate. They are slightly curved and have a triangular head and a rounded tip. The lengths of the spicules are between 30-80  $\mu\text{m}$ . The gubernaculum is ventrally flattened, and it follows the contour of the spicules. The proximal tip is curved upward. The length of the gubernaculum is 20-30  $\mu\text{m}$ .

*Habitat and locality:* soil around the roots of sugar cane (*Saccharum officinarum*) in Morelos, Mexico.

The male, female and IJ specimens were deposited in the Nacional Collection of Helminthes of the Biology Institute of the National Autonomous University of Mexico (CNHE/UNAM) with registration number 11085

*Diagnosis:* *O. myriophila* belongs to the insectivora group and exhibits a cylindrical pharynx, a body with a leptoderan bursa and eight genital papillae of different lengths arranged in a 1 + 1 + 3 + 3 formation.

*O. sacchari* was isolated from sugar cane soil and belongs to the insectivora group. It presents similarity in the morphology of the anterior part that is a characteristic of the genus. *O. sacchari* is similar to *O. myriophila* in the body length of males (average: 843 vs 862  $\mu\text{m}$ ), but exhibits a different body width (average 61.6 vs 28  $\mu\text{m}$ ) and longer spicules (average: 41 vs 50  $\mu\text{m}$ ).

Posterior part arrangement with the papillae in a 1+1+1+3+3. In females, shorter body lengths (average: 1607 vs 964.5  $\mu\text{m}$ ) and narrower body widths (average: 37 vs 88  $\mu\text{m}$ ) were observed.

*O. necromenus* is similar to *O. myriophila* in the body length of males (average: 843 vs 790  $\mu\text{m}$ ), but those of females differ (average: 964.6 vs 1179  $\mu\text{m}$ ) as does their body width (average 28- 46  $\mu\text{m}$ ), and they exhibit longer spicules and a longer gubernaculum (average: 41 vs 40; 22 vs 15  $\mu\text{m}$ , respectively). Detailed species comparisons for the genus of *Oscheius* are given in Table 1.

Based on the morphometric characteristics of males and females that are commonly used for the identification of nematodes, 10 females and 10 males were observed under a microscope (Nikon eclipse e200), and morphometric measurements were performed (Table 1). The maximum and minimum ranges of the body length were obtained: L, body width: W, spicules, distance from the part before the vulva, and length of eggs. The average values were calculated.

### **2.3 Molecular identification**

For molecular identification, an 832 bp fragment of the D2D3 region of the 28s ribosomal gene was amplified by PCR. The sequence of the MC5 2014 isolate was deposited in GenBank under accession number MK418537, showing 99% identity with DF5020 of *O. myriophila* isolated in the United States.

In Turkey (Zeynep et al., 2017), a nematode associated with *G. gryllotalpa* was isolated, and similar to our work, these authors used IJs for DNA extraction. They obtained 99% identity with *O. myriophila* Gg1 and an isolate from the USA (AY602176).

Notably, Torini et al. (2015) reported a new species of entomopathogenic nematode belonging to the genus *Oscheius* using the D2D3 region of 28s rDNA, as in our investigation.

### **2.4 Bacterial symbiont isolation and identification**

For the macerated extraction and the hemolymph extraction methods, the bacterial colonies were isolated at 48 and 72 hours, grown on solid LB and HCT agar plates, and initially assigned as MC5-R based on red colonies. The biochemical tests showed that the bacterial strain MC5-R was Gram negative and was positive for motility tests, protease activity and lecithin activity. From the genomic DNA extraction product, a fragment of 600 bp was obtained. Once obtained, the PCR products were sent to the Institute of Biotechnology of UNAM (National Autonomous University of Mexico). The sequence of the isolated MC5-R was deposited in GenBank with the accession

number MK463930. A BLAST search indicated 100% similarity with an MK463930 sequence and *S. marcescens* with accession number KM099142.1.

### **2.5 Pathogenicity of the bacterium**

The percentage of mortality in *G. mellonella* larvae of the 5th instar resulting from treatment with a concentration of  $1 \times 10^5$  was 100% for bacterial isolate MC5-R, 96.66% for *S. marcescens* Bar 86 and 0% for the *E. coli* ATCC and sterile distilled water negative controls.

### **2.6 Virulence of the bacterium**

The percentage of mortality for *G. mellonella* larvae of the 5th instar resulting from treatment at a concentration of five cells per larvae was 76.66% for the bacterial isolate MC5-R and 0% and 1.11% for the *E. coli* ATCC and sterile distilled water negative controls, respectively (Figure 1). The result obtained with the bacterial strain MC5-R was an  $LD_{50} < 10$  cells injected in *G. mellonella* larvae at the 5<sup>th</sup> instar and the positive control *S. marcescens* Bar 86 showed an  $LD_{50} < 10$  cells, while that for the negative controls *E. coli* ATCC and distilled water was 0%.

### **2.7 Virulence of the nematode MC5-2014 isolate.**

The mean lethal concentration was 4.732 IJ in *G. mellonella*. In EPN virulence evaluations in sugar cane borers, Grifaldo (2010) evaluated steinernematids in *D. saccharalis* and obtained an  $LC_{50}$  of 3.7 IJ. The values obtained in this investigation were greater, and it should be taken into account that the behavior of the entomopathogens was different; this difference in virulence is influenced by different factors, such as the search strategy (Grewal et al., 1994) as well as their penetration and infectivity. In this study, *O. myriophila* was isolated, identified and evaluated, and solid evidence that it has potential to be used as an entomopathogenic nematode is provided; it is worth mentioning that it is necessary to carry out an evaluation of the transmission of the bacteria to subsequent generations of nematodes (Dillman et al., 2012). The MC5-2014 isolate was virulent to *G. mellonella* larvae as quickly and efficiently as the isolated bacteria. An  $LC_{50}$  of 4.73 IJs/ml and an  $LD_{50}$  of  $< 10$  cells were obtained for the bacterium. The existing reports mention that species of the family Rhabditidae are pathogenic against pests with the aid of bacterial strains of the genus

*Serratia*, which is the same bacterial species as the nematode MC5-2014 (Abebe et al., 2010; Ye et al., 2010; Torres-Barragan et al., 2011; Zhang et al., 2012).

Currently, species belonging to the genus *Oscheius* have been reported as EPNs, and the results obtained in our research highlight the potential of *O. myriophila* to be used in the future in biological control. However, to consider *O. myriophila* as an EPN, it is necessary to perform more evaluations on the type of association that exists with the bacteria isolated from this nematode.

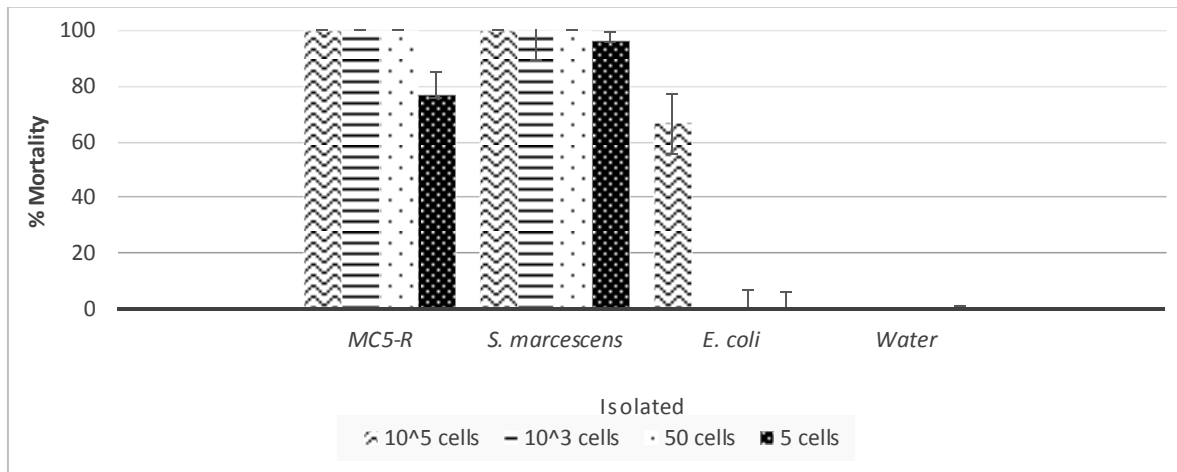


Fig.

1. Mortality of *Galleria mellonella* larvae exposed to the MC5-R bacterium after 48 hours. 1: MC5-R, 2 *S. marcescens*, 3: *E. coli*, 4: water, means  $\pm$  SD (range).

Table 1. Comparison of morphometrics with the MC5-2014 isolate

Characteristic	<i>Rhabditis myriophila</i> Poinar, 1986	<i>Oscheius myriophila</i> Tabassum <i>et al.</i> , 2016	<i>Oscheius myriophila</i> MC5-2014	<i>Oscheius sacchari</i> Tabassum <i>et al.</i> , 2016	<i>Oscheius rugaroensis</i> Zhang <i>et al.</i> , 2012	<i>Oscheius necromenus</i> Sudhaus and Schulte, 1989
Locality	California	Turkey	Mexico	Pakistan	China	Iran
Type	<i>Oxidis gracilis</i>		Soil,	Soil,	Soil	
host/habitat						
<u>Female</u>						
L	-	-	964.5	1607	1042	1179
	-	(972-1530)	(760-1160)	(1362-2015)	(920-1179)	(830-1500)
W	-	-	37	88	49.5	69
	-	(52-100)	(30-60)	(72-125)	(39.8-58.2)	(54-90)
V	-	-	554	-	-	-
	-	-	(410-760)	-	-	-
Eggs	-	-	52	-	-	-
	-	-	(50-56)	-	-	-
<u>Male</u>						
L	-	-	843	862	1396	790
	(830-1470)	(841-1175)	(720-910)	(760-1390)	(1195-1692)	(671-950)
W	-	-	28	61.6	62.4	46
	(380-800)	(52-72)	(20-30)	(53-75)	(46.3-66.2)	(36-50)
Spicules	-	-	41	50	49.2	40
	-	(27-39)	(30-40)	(47-55)	(35.2-60.9)	(34-44)
G	-	-	22	20.3	19.7	15
	-	-	(20-30)	(18-22)	(19.9-26.5)	(12-23)

L: total body length, W: maximum body width, V: vulva and G: gubernaculum



## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge Dr. Veronica Obregón Barbosa and M in C. Laura Patricia Lina García for providing the biological material. The State Committee of Plant Health of the State of Morelos A. C provides information on and the locations of crops infected with *D. magnifactella*. Conacyt/México provided a scholarship for doctoral studies to I.R.C.O.

## LITERATURE

Abebe E, Jumba M, Bonner K, Gray V, Morris K. 2010. An entomopathogenic *Caenorhabditis briggsae*. J Exp Biol 213: 3223–3229.

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

Adams, B.J., Fodor, A., Koppenhofer, H.S., Stackenbrandt, E., Stock, S.P., Klein, M.G. 2006. Biodiversity and systematics of nematode-bacterium entomopathogens. Bio Control 39: 4-21.

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. 1986. *Xenorhabdus nematophilus* subsp. *poinarii*: its interaction with insect pathogenic nematodes. Systematic and Applied Microbiology 8: 142-147.

Akhurst, R.J. y Boemare, N.E. 1988. A numerical taxonomy study of genus *Xenorhabdus* (Enterobacteriaceae) and proposed elevation of the subspecies of *X. nematophilus* to species. Journal of General Microbiology, 134, 18-35.

Akhurst, R.J., Bedding, R.A, Bull, R.M., Smith, D.R. 1992. An epizootic of *Heterorhabditis* spp. (Heterorhabditidae): Nematology 15: 71-73.

Alatorre-Rosas, R., 1971. El uso de *Neoplectana dutkyi* Jackson, 1965 (DD-136)

Ames, L.M y Smart, G. C. Jr. 1989. Migration of an entomogenous nematode, *Steinernema* sp through selected Florida soils. J. Nematol. 21: 550.

Andrassy, I. 1983. A taxonomic review of the suborder Rhabditina (Nematoda: Secernentia). Orstom, Paris. 241 pp.

Baker, G.L. y Capinera, J.H. 1997. Nematodes and nematomorphs as control agents of grasshoppers and locusts. *Memiors of the Entomological Society of Canada*, 171, 157-211

Birt, A. F., y Birt, J. 1986. Observations on the use of insect parasitic nematodes as means of biological control of root-knot nematodes. *Int. J. Parasitol.*16(5): 511-516.

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

Boemare, N.E. 2002. Biology, taxonomy and systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In Glauderb R. ed. *Entomopatogenic Nematology*. CABI publishing wallingford, Uk; pp35-56.

Boemare, N.E., Akhurst, R.J., y Mourant, R. G. 1993. DNA relatedness between *Xenorhabdus* spp.(Enterobacteriaceae), Symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes, and aproposal to transfer *Xenorhabdus* to a new genus, *Photorhabdus* gen. nov.*int J. Sys. Bacteriol.* 43: 249-255.

Boemare, N.E., Laumond, C. y Manuleon, H. 1996. The entomopathogenic nematode bacterium complex: biology, life cicle and vertebrade safety. *Biocontrol Science and Technology*, 6, 33-34.

Burman, M., y Pye, A.E. 1980. *Neoplectana carpocapse*: respiration of infective juvenile. *Nematologica*, 26 214-218.

Caspeta-Mandujano, J.M. 2010. Nemátodos 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, O.I.R. 2015. Nemátodos entomopatógenos 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. Centro de Investigaciones en Biotecnología.

Castro, O.I.R. 2010. Evaluación de cepas de nemátodos y hongos entomopatógenos del estado de Morelos. Tesis para obtener el grado de Ingeniero Hortícola. Universidad Autónoma del Estado Dde Morelos. Facultad de Ciencias Agropecuarias.

Choo, H. Y., Kaya, H. K., Stock, S.P. 1995. Isolation of entomopathogenic nematodes (*Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*) from Korea. *Jpn. J Nematol.* 25(1): 44-51.

Choo, H.Y. y Kaya, H.k. 1991. Influence of soil texture and presence of roots on host finding by *Heterorhabditis bacteriophora*. *Jornal of Invertebrate Pathology*, 58, 279-280.

Curran, J. 1990. Molecular techniques in taxonomy. In "Entomopathogenic Nematodes in Biological Control-1990" (R. Gaugler, and H. K. Kaya, EDS. 63-74 CRC Press, Boca Raton, Fl.

De Ley, P. & 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.

Dillman AR, Chaston JM, Adams BJ, Ciche TA, Goodrich-Blair H, Stock SP, et al. (2012) An Entomopathogenic Nematode by Any Other Name. *PLoS Pathog* 8(3): e1002527. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002527>

Dillman, A.R., Chaston, J. M., Adams, B.J., Ciche, T.A., Goodrich- Blair, H., Stock, S.P., and Sternberg, P.W. 2012. An entomopathogenic nematode by any other name. *PLoS Pathog* 8:e1002527.

Dix, S., A.M., Griffin, C. T., Joyce, S.A., Nugent M. J., Y Downes, M.J. 1992. The identifacartion of biological species in the genus *Heterorhabditis*(Nematoda: Heterorhabditidae) by cross- breeding second-generation ampliphimintis adults. *Parasitology*. 104: 509-518.

Doucet, M. M. A. 1990. *Steinernema ritteri* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae) with a key to the species of the genus. *Nematologica* 36: 257-265.

Dowenens, M.J., y Griffin, C.T.1996. Dispersal behavior and transmission strategies of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis* and *Steinernema*. *Biocontrol Science and Technology*, 6, 347-356.

Dujardin, F.1845. *Histoire naturelle des helminthes ou vers intestinaux*. Paris, 654.

Dutky, S. R., and Hough, W. S. 1955. Note on a parasitic nematode from codling moth larvae, *Carpocapsae pomonella*. *Proceedings of the Entomological Society of Washington* 57:244.

Ehlers, R. U. 1990. Some contemporary signes in biological control of insects and their relevant to the use of entomopatogenic nematodes En *Entomopatogenic nematodes in biological control*. CRC Press, Boca Raton F1.pp: 1-19.

Emelianoff V., N. Le Brun, S. Pagès, S.P. Stock, P. Tailliez, C. Moulia, M. Sicard. 2008. Isolation and identification of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria from Hérault and Gard (Southern France) *Journal of Invertebrate Pathology*. 98 (2): 211-217.

*Entomophaga* 28, 309–315

Gaugler, R, y Boush, G. M. 1978. Efects of ultraviolet radiation y sunlight on the entomogenous nematode, *Neoplectana carpocapsae*. *Journal of invertebrate, pathology*, 32, 291-296.

Gaugler, R, y Boush, G. M. 1979. Laboratory test on ultraviolet protectants of an entomogenous nematode. *Enviroment*

Gaugler, R. (ed.) 2002. *Entomopathogenic Nematology*. CABI, New York, USA.

Gaugler, R., Kaplan, B., Alvarado, C., Montoya, J., Ortega, M., 1983. Assessment of *Bacillus thuringiensis* serotype 14 and *Steinernema feltiae* (Nematoda: Steinernematidae) for control of the *Simulium* vectors of onchocerciasis in Mexico.

Gaugler, R., Kaya, H. K. 1990. Entomopathogenic nematodes in biological control CRC Press, Boca Raton, pp: 365.

Georgis, R y Poinar, G. O. Jr. 1993. Effect of soil texture on the distribution and infectivity of *Neoplectana carpocapsae* (Nematoda: Steinernematidae). J. Nematol. 15(2): 308-311.

Georgis, R. y Poinar, G.O. 1983. Effect of soil textures on the distribution and infectivity of *Neoplectana glaseri* (Nematode: Steinernematidae) Journal Nematology, 15, 329-332

Georgis, R., y Poinar, G.O. Jr. 1994. Nematodes as bioinsecticides in turf and ornamentals. En A.R. Leslie y U.S.E.P.A.(Eds), Hybook of integrated pest management for turf and ornamentals 477-489. Boca Raton, FL.:CRC Press.

Grewal, P.S, Selvan, S. y Gaugler, R. 1994. Thermal adaptation of entomopathogenic nematodes: Niche breadth for infection, establishment, and reproduction. J. Thermal Biol. 19: 245-253.

Grewal, P.S., Brow, I., Stuart, R.J., Koppenh, A.M. y Polavarapu, S. 1999. insecticidal nematode laboratory. En Sridhar Polavarapu ed.

Grewal, P.S., Selvan, S., and Gaugler, R. 1994. Thermal adaptation of entomopathogenic nematodes: Niche breadth for infection, establishment, and reproduction. Journal Thermal Biol. 19:245-253.

Grifaldo, A.F., Alatorre, R.R., Segura, L.O., and Hernandez, R.F. 2010. *Steinernema ralatorei* n. sp. isolated from sugarcane areas at Veracruz, Mexico. Source Southwestern Entomologist. 42:171-190.

Griffin, C.T., Downes, M.J., Block, W. 1990. Test of Antarctic soils for insect parasitic nematodes. Antarctic Sci. 2:221-222.

Griffin, C.T., Downes, M.J., Block, W., 1990. Test of Antarctic soils for insect parasitic nematodes. Antarctic Sci. 2: 221-222.

Hominick, W. M. 2002. Biogeography. In. Entomopathogenic Nematology. Glaugler R. ed. CABI Publishing. Wallingford, UK; 115-143.

Hominick, W.M., Reid, A-P., Bohan, D.A., and Briscoe, B.R. 1996. Entomopathogenic nematodes - biodiversity, geographical distribution and the convention on biological diversity. *Biocontrol Science and Technology*, 6 (3), 317-331. *al Entomology*, 8, 810-813.

Hominik, W.M., Reid, A.P., Bohan, D.A., and Briscoe, B.R. 1996. Entomopathogenic nematodes: Biodiversity, geographical distribution and the convention on biological diversity. *Biocontr. Sci. Tech nol.* 6:317-331

Howlett B.J, Brownlee A.G, Guest D.I, Adcock G.J, Fadden G.I.1992. The 5S ribosomal RNA gene is linked to large and small subunit ribosomal RNA genes in the omycetes, *Phytophthora vignae*, *P. cinnamomi*, *P. megaspera* f. sp. *Glycinae* and *Saprolegnia ferax*. *Current Genetics* 22:455–461.

Hu, K., Li, j., Wang, W., Houming, W., Lin, H. y Webster, J.M. 1998. Comparison of metabolites produced in vitro and vivo by *Photorhabdus luminescens*, a bacterial symbiotic of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis megidis*. *Can Journal Microbiol*, 44, 1072-1077.

Ishibashi, N., y Kondo, E. 1987. Dynamics of the entomopatogenous nematode *Steinernema feltidae* applied to soil whith and without nematicid treatment, *J. Nematol.* 19: 404-412.

Joyce, S.A., Reid, A., Driver, F., and 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. K. 1985. Entomogenous nematodes for insect control in IPM systems. In: biological control in Agricultural IPM systems. (M. A. Hoy y D. C. Herzog, Eds.) 283-302. Academic Press.

Kaya, H.K y Stock, S.P. 1997. Manual of techniques in insect nematology. Pp303-305.

Kaya, H.K., y Koppenhofer, A.M. 1999. Biology and ecology of insecticidal nematodes. En S. Polavarapu (Ed). Optima use of insecticidal nematodes in pest management (pp1.8). New Brunswick, New Jersey: Rutgers University.

Kung, S.P., Gaugler, R., y Kaya, H.K. 1990. Influence of soil pH and oxygen on persistence of *Steinernema spp.* J. Nematol. 22: 440-445.

Kuwata, R., Shingemansu, M., Yoshiga, T., Yoshida, M., Kondo, E. 2006. Phylogenetic analyses of Japanese steinernematid nematodes and their associating *Xenorhabdus bacteria* Japanese journal Nematology 36(2): 75-85.

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

Lezama, G.R., Hamm, J.J., Molina, O.J, Lopez, E.M., Pescador, R.A., Gonzalez, R.M., and Styler, E.L. 2001. Occurrence of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Mexican states of Michoacan, Colima, Jalisco and Tamaulipas. FloridaEntomol, 84:23-30.

Li, J., Chen, G. H., y Webster, J.M. 1995. Identification of two pigments and hydroxystibene antibiotic from *Photorhabdus luminescens*. Applied and Environmental Microbiology, 61, 4329-4333.

Lindgren, J.E., Rij, R.E., Ross, S.R, y Fouse, D.c. 1986. Respiration rate of Steinernemafeltiae infective juveniles at constant temperature. Journal of Nematology, 18 221-224



## Literatura citada

Akhurst RJ, Boemare NE. 1990 Biology and Taxonomy of *Xenorhabdus*, Pp. 75–90 in R. Gaugler, and H. K. Kaya, eds. Entomopathogenic nematodes in Biological Control. Boca Raton: CRC Press

Akhurst, R. J., y Boemare, N. E. 1988. A numerical taxonomy study of genus *Xenorhabdus* (Enterobacteriaceae) and proposed elevation of the subspecies of *X. nematophilus* to species. *Journal of General Microbiology*, 134, 18-35.

Campbell, J. F., y Gaugler, R. 1997. Inter specific variation in entomopathogenic nematode foraging strategy: Dichotomy or variation along a continuum. *Fundam. Appl. Nematol.* 20: 393-398.

Campbell, J.F. y Kaya, H.K. 1999. How and why a parasitic nematode jumps *Nature*, 397 (1) 485-486.

Dutky SR, Hough WS. 1955 Note on a parasitic nematode from codling moth larvae, *Carpocapsae pomonella*. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*.;57:244.

Dutky SR. 1959 *Insect Microbiology. Advances in Applied Microbiology.* 1:175–200

Fujie, A, y Yokoyama, T. 1998. Effects of ultraviolet light on the entomopathogenic nematode, *Steinernema kushidai* and its symbiotic bacterium, *Xenorhabdus japonicus*. *Applied Entomology and Zoology*, 33 (22), 263-264.

Gaugler, R., Kaya, H. K. 1990. Entomopathogenic nematodes in biological control CRC Press, Boca Raton, pp: 365.

Gaugler, R., y Boush, G.M. 1978. Effects of ultraviolet radiation y sunlight on the entomogenous nematode, *Neoplectana carpocapsae*. *Journal of invertebrate, Pathology*, 32, 291-296.

Georgis , R. 1992. Present and future prospects for entomopathogenic nematode products. *Biocontrol Science and Tecnology*, 2 83-99.

Glaser RW, Fox H. A. 1930. Nematode parasite of the Japanese beetle (*Popillia japonica* Newm.) *Science*.;71:16–17.

Glazer, I. 1996. Survival mechanisms of entomopathogenic nematodes. *Biocontrol Science and Technology*, 6 343-378.

Hominick, W.M., Brriscoe, B.R., Del Pino, F.G., Heng, J., Hunt, D.J., Kozodoi, E., Mracek, Z., Nguyen, K.B., Reid, A.P., Spiridonov, S., Stock, S.P., D., Waturu, C., y Yoshida, M. 1997. Biosystematics of entomopathogenic nematodes: Current status, protocols and definitions. *Journal of Helminthology*, 71: 271-298.

Hominick, W.M., Brriscoe, B.R., Del Pino, F.G., Heng, J., Hunt, D.J., Kozodoi, E., Mracek, Z., Nguyen, K.B., Reid, A.P., Spiridonov, S., Stock, S.P., D., Waturu, C., y Yoshida, M. 1997. Biosystematics of entomopathogenic nematodes: Current status, protocols and definitions. *Journal of Helminthology*, 71: 271-298.

Joyce, S.A., 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

Kiontke K, Barrière A, Kolotuev I, Podbilewicz B, Sommer R, Fitch DHA, Félix M-A. 2007.. Trends, Stasis, and Drift in the evolution of nematode vulva development. *Current Biology*;17:1925

Lewis, E. E., Glaugler, R., y Harrison, R. 1993. Response of crusier and ambusher entomopathogenic nematodes (Steinernematidae) to host volatile cues. *Can. J. Zool.* 71:765-769.

Li, J., Chen, G.H. y Webster, J.M. 1995. Identification of two pigments and hydroxystilbene antibiotic from *Photorhabdus luminescens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 4329-4333

Mancilla J.P., A. Abelleiria, C. Pintos, O. Aguin, R. Pérez, B. Loureiro, M.D. Montenegro. 2004. Método de extracción de ADN en nemátodos para su aplicación en el diagnóstico por técnicas moleculares. XX Reunión Anual del Grupo de Trabajo de Laboratorios de Diagnóstico y Prospecciones Fitosanitarias. Pontevedra. McCarthy C. 1996-1998. Chromas vr. 1.45 (32 bit) Queensland, Australia.

Milstead JE. 1977. The life cycle and pathobiology of *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar (Rhabditoidea: Nematoda) in its lepidopteran hosts. Ph.D. dissertation. University of California, Berkeley, 113 pp

Morgan, J.A.W., Kunzenlman, V., Tavenor, S., Ousley, M.A y Winstanley, C. 1997. Survival of *Xenorhabdus nematophilus* and *Photorhabdus luminieens* in water and soil. Journal of Applied Microbiology, 83. 665-670.

Mrápek Z, K.B. Nguyen, P. Tailliez, N. Boemare, S. Chen. 2006. *Steinernema sichuanense* n. sp. (Rhabditida, Steinernematidae), a new species of entomopathogenic nematode from the province of Sichuan, east Tibetan Mts., China Journal of Invertebrate Pathology. 93 (3): 157-169.

Negrete-García, Román. 2013. Nematodos entomopatógenos procedentes de la rizosfera de suelos maiceros infestados con la gallina ciega *Phyllophaga polyphylla* Bates. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Edo. de México. 84 p

Nematoda, Neoaplectanidae en la lucha contra algunas plagas de insecto. Bachelor's thesis. Universidad Autonoma de Mexico, Mexico City, Mexico.

Nguyen K. B, Hunt DJ. 2007. Entomopathogenic nematodes: systematics, phylogeny and bacterial symbionts. Hunt DJ, Perry RN, eds. Leiden- Boston: Brill.

Nguyen K.B., V. PĚřa, Z. Mrápek. 2008. *Steinernema cholashanense* n. sp. (Rhabditida, Steinernematidae) a new species of entomopathogenic nematode from the province of Sichuan, Chola Shan Mountains, China. Journal of Invertebrate Pathology. 97 (3): 251-264.

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

Nguyen, K. B., y Smart, G. C. Jr. 1994. *Neosteinerma longicurvicauda* n.gen.n.sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a parasite of the termite *Reticulitermes flavipes* (Koller). *J. Nematol.* 26: 162-174.

Nguyen, K.B. y Smart, G.C. 1996. Identification of entomopatogenic nematodes in the Steinernematidae and Heterorhabditidae (Nemata: Rhabditidae) *Nematol.* 28: pp: 286-300.

Nguyen, K.B., and Smart, G.C. 1996. Identification of entomopatogenic nematodes in the Steinernematidae and Heterorhabditidae (Nemata: Rhabditidae) *Nematology.* 28:286-300.

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

Nguyen, K.B., y Smart, G.C. 1997. Scanning electron microscope studies of spicules and gubernaculum of *Sternemema* spp. *Nematologica*, 43: 465-480.

Nübel, U., Engelen, B., Felske, A., Snidr, J., Wieshuber, A., Amann, R., Ludwig, W., and 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., Lee, M.M., and Stock, S.P. 2014. Soil sampling and isolation of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae, Heterorhabditidae). *Journal of Visualized Experiments* 11;(89), doi: 10.3791/52083

Paul, V.J., Frautschy, S., Fenical, W., y Neilson, K.H. 1981. Antibiotics in microbial ecology: isolation and structure assignment of several new antibacterial compounds from the insect-symbiotic bacteria *Xenorhabdus* spp. *Journal Chemical Ecology*, 7, 589-597.

Pérez, Y., M. E. Márquez Gutiérrez y M. Gómez. 2006. Características de la fase primaria de las bacterias simbioses de los nemátodos entomopatógenos *Steinernema cubanum*, *Hepteorhabditis indica* y *H. bacteriophora*. Fitosanidad. 10 (3): pp 193-195. pp. 3-17.pp5-8.

Poinar GO, J. 1983. The natural history of nematodes. Engelwood Cliffs: Prentice Hall.

Poinar GO, Jr, Georgis R. 1990 Characterization and field application of *Heterorhabditis bacteriophora* strain HP88 (Heterorhabditidae: Rhabditida) Revue de Nématologie;13:387–393.

Poinar GO, Jr, Hess RT, Lanier W, Kinney S, White JH.1989. Preliminary observations of a bacteriophage infecting *Xenorhabdus luminescens* (Enterobacteriaceae) Experientia.;45:191–192

Poinar GO, Jr, Hess RT, Thomas G.1980 Isolation of defective bacteriophages from *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae) IRCS Medical Science. 8:141

Poinar GO, Jr, Thomas GM, Hess R. 1977. Characteristics of the specific bacterium associated with *Heterorhabditis bacteriophora* (Heterorhabditidae: Rhabditida) Nematologica. ;23:97–102.

Poinar GO, Jr, Veremtshuk GV. 1979. A new strain of entomopathogenic nematodes and geographical distribution of *Neoaplectana carpocapsae* Weiser (Rhabditida, Steinernematidae) Zoological Journal.;49:966–969.

Poinar GO, Jr. 1986 Hom A. Survival and horizontal movement of infective stage *Neoaplectana carpocapsae* in the field. Journal of Nematology. 18:34–36.

Poinar GO., Jr . 2011. The Evolutionary History of nematodes. Brill, Leiden, 439 pp

Poinar GO., Jr . 2011. The Evolutionary History of nematodes. Brill, Leiden, 439 pp

Poinar GO., Jr. 1966 The presence of *Achromobacter Nematophilus* Poinar and Thomas in the infective stage of a *Neoaplectana* sp. (Steinernematidae: Nematoda) Nematologica.12:105–108

Poinar, G. O. 1990 a. Taxonomy and Biology of steinernematidae and heterorhabditidae. En: entomopathogenic nematodes in biological control CRC Press, Boca Raton pp:23-61.

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

Poinar, G.O. 1986. *Rhabditis myriophila* sp. (Rhabditidae:Rhabditida), associated with the millipede, *Oxidis gracilis* (Polydesmida: Diplopoda), Proceedings of the Helminthological Society of Washington 53:232-236.

Poinar, G.O. Jr. 1979. Nematodes for biological control of insects. Boca Raton, Fl. USA: CRC. Press.

Richardson P.N., y Grewal P.S. 1994. Entomopathogenic nematodes and the soil environment. Ecology and biology of soil organisms. Bhandari S.C., Somani L.L.(Eds). 105-130 Agrotech Publishing Academy. Udaipur, India.

Richardson, W.H., Schmidt, T.M., y Neilson, K. H. 1988. identification of anthraquinone pigment and ahydroxystilbene antibiotic from *Xenorhabdus luminescens*

Richardson, W.H., Schmidt, T.M., y Neilson, K.H.1988. Identification of anthquinone pigmen and ahydroxystilbene antibiotic from *Xenorhabdus luminescens*.

Rodou, A

Rovesti, L., Heinzpeter, E.W., Tagliente, F., y Deseo, K.V. 1988. Compatibility of pesticides with the entomopatogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar. (Nematoda: Heterorhabditidae) Nematologica 34: 462-476.

Rovesti, L., y Deseo, K.V. 1990. Compatibility of chemical pesticides with the entomopatogenic nematodes, *Steinernema carpocapside* Weiser and *S. feltidae* Filipjev (Nematoda: Steinernematidae Nematologica 36: 237-245.

San-Blas, E. 2013. Progress on entomopatogenic nematology research: A bibliometric study of the last three decades: 1980–2010. Biological control 66, 102-124.

Simoës, N., y Rosa, J.S. 1996. Pathogenecity and host specificity of entomopatogenic nematodes. Biocontrol Science and Techology, 6 403-411.

Simons, W. R. 1973. Nematode survival in relation to soil moisture. Medd. Landbouwhogeschool Wageningen. 73: 1.75

Smits, P. H., Groenen, J. T. M., y Raay, G. 1991. Characterization of *Heterorhabditis isolates* using DNA restriction fragment length polymorphism. Revue. Nematol. 14: 445-453.

Sosa D.R., Tigano, M.S., y Arantes, O.M. 1998. Caracterizacao de entomopatógenos. En Alves, S.B. Ed, Controle microbiano de insectos. Characterization of entomopatogenic. Control microbian of insects. 22: 731-763.

Stock S.P., J.M. Campbell, S.A. Nadler. 2001. Phylogeny of *Steinernema* Travassos, 1927 (Cephalobina: Steinernematidae) inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters. Journal of Parasitology 87 (4): 877-889.

Stock SP, Hunt DJ. 2005. Morphology and systematics of Nematodes used in Biocontrol. In Grewal, P. S., Ehlers, R-U., and Shapiro-Ilan, D. I. Nematodes as biocontrol agents. Wallingford: CABI Publishing.

Stock, S.P. y Kaya, H. K. 1996. A multivariate analysis of morphometric characters of *Heterorhabditis* species (Nemata: Heterorhabditidae) and the role of morphometrics in the taxonomy of species of the genus. J. Parasitol.82: 806-813.

Stock, S.P., Pryor, B.M Y Kaya, H.K. 1999. Distribution of entomopathogenic nematodes ( Steinernematidae and Heterorhabditidae) in natural habitats in California, USA. Biodiv. Conserv. 8:535-549.

Stock, S.P., Rivera O.P., and Flores, L.Y. 2009. *Heterorhabditis sonorensis* n. sp. (Nematoda: Heterorhabditidae), a natural pathogen of the seasonal cicada *Diceroprocta ornea* (Walker) (Homoptera: Cicadidae) in the Sonorandesert. Journal of Invertebrate Pathology 100:175-184.

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

Sudhaus W. 2008. Evolution of insect parasitism in rhabditid and diplogastrid nematodes. In: Makarov SE, Dimitrijevic RN, eds. *Advances in arachnology and developmental biology*. Vienna- Belgrade-Sofia: SASA. pp 143–161.

Sudhaus, W. 1976. Vergleichende untersuchungen zur phylogenie, Systematik, Okologie, Biologieand Ethologie der Rhabditidae (Nematoda). *Zoologica*, 43:1- 229.

Sudhaus, W. 2008. Evolution of insect parasitism in rhabditid and diplogastrid nematodes. In: Makarov SE, Dimitrijevic RN, eds. *Advances in arachnology and developmental biology*. Vienna- Belgrade-Sofia: SASA. 143–161.

Tabassum, K.A., and Shahina, F. 2002. *Oscheius maqbooli* n. sp. and observation on three know Rhabditis species (Nemata: Rhabditida) from sugarcane fields of Balochistan, Pakistan. *Pakistan Journal of Nematology*, 20:1-21.

Tabassum, K.A., and Shahina, F. 2010. *Oscheius siddiqii* and *O. niazii*, two new entomopathogenic nematode species from Pakistan, with observation on *O. shamimi*. *International Journal of Nematology*, 20:75-84.

Tabassum, K.A., Shahina, F.N., and Erum, Y.I. 2016. Description of six new species of *Oscheius* Andrassy, 1976 (Nematoda: Rhabditida) from Pakistan with a key and diagnostic compendium to species of the genus. *Pakistan Journal of Nematology* 34:109-161.

Tanada, P, y Kaya, H, K. 1993 *Insect Pathology*. San Diego, California: Academic Entomologist, 127, 865-875

Thomas GM, Poinar GO., Jr. 1979 *Xenorhabdus* gen. nov., a genus of entomopathogenic, nematophilic bacteria of the family Enterobacteriaceae. *International Journal of Systematic Bacteriology*.;29:352–360.



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

Torrini, G., Mazza, G., Carletti, B., Benvenuti, C., Roversi, P. F., Fanelli, E., Luca, F. D., Troccoli, A. & Tarasco, E. 2015. *Oscheius* Description of six new species of *Oscheius* Andrassy, 1976 (Nematoda: Rhabditida) from Pakistan 161 *O. onirici* sp. n. (Nematoda: Rhabditidae): a new entomopathogenic nematode from an Italian cave. *Zootaxa*, 26, 533-548.

Torrini, G., Mazza, G., Carletti, B., Benvenuti, C., Roversi, P. F., Fanelli, E., Luca, F. D., Troccoli, A., and Tarasco, E. 2015. *Oscheius* Description of six new species of *Oscheius* Andrassy, 1976 (Nematoda: Rhabditida) from Pakistan 161 *O. onirici* sp. n. (Nematoda: Rhabditidae): a new entomopathogenic nematode from an Italian cave. *Journal Zootaxa*, 26:533-548.

Torrini, G., Mazza, G., Carletti, B., Benvenuti, C., Roversi, P.F., Fanelli, E., Luca, F. D., Troccoli, A., and Tarasco, E. 2015. *Oscheius* Description of six new species of *Oscheius* Andrassy, 1976 (Nematoda: Rhabditida) from Pakistan 161 *O. onirici* sp. n. (Nematoda: Rhabditidae): a new entomopathogenic nematode from an Italian cave. *Journal Zootaxa*, 26:533-548.

Wallace, H.R. 1958. Movement of eel worms. I. The influence of pore size and moisture content of soil on the migrations of larvae of the beet eelworm, *Heterodera schachtid.* *Ann Appl. Biol.* 46: 74-85.

Wallace, M.K.; R.H.; Haawkins, D.M.; Macdonald, D.H. 1993. Correlation of edaphic factors with plant parasitic nematode population densities in forage field. *Journal of nematology* 25 (4):642-653.

Webster JM, Chen G, Hu K, Li J. 2002. Bacterial metabolites. Pp. 99–114 in R. Gaugler, ed. *Entomopathogenic Nematology*. Oxon, UK: CAB International.

Weiser, J. 1955. *Neoaplectana carpocapsae* n. sp. (Anguillata, Steinernematidae) nový cizopasník housenek obalece jablecneho, *Carpocapsae pomonella* L. Vestník Československé Společnosti Zoologické 19:44–52

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

Woodring, J.L. y Kaya, H. K. 1988. Steinernematid and heterorhabditid nematodes: A handbook of techniques. Southern Cooperative Series Bulletin N. 331. Arkansas Agricultural Experimental Station Fayetteville, Arkansas. 30.

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

Ye WM, Torres-Barragan A, Cardoza YJ (2010) *Oscheius carolinensis* n. sp (Nematoda: Rhabditidae), a potential entomopathogenic nematode from vermicompost. *Nematology* 12: 121–135. 11. Abebe E, Jumba M, Bonner K, Gray V, Morris K, et al. (2010) An entomopathogenic *Caenorhabditis briggsae*. *J Exp Biol* 213: 3223–3229

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

Zeynep, E., İsmail, D., and Zihni, D. 2017. Isolation and characterization of a parasitic nematode, *Oscheius myriophila* (Nematoda: Rhabditida), associated with european mole cricket, *Gryllotalpa gryllotalpa* (Orthoptera: Gryllotalpidae). *Journal Biology and Chemistry*45:197-2

Zeynep, E., İsmail, D., Zihni, D. 2017. Isolation and Characterization of a Parasitic Nematode, *Oscheius myriophila* (Nematoda: Rhabditida), Associated with European Mole Cricket, *Gryllotalpa gryllotalpa* (Orthoptera: Gryllotalpidae). *Journal Biol. & Chem*, 45:197-2

Zhang, C., Liu, J., Xu, M., Sun, J., Yang, S., An, X., Gao, G., Lin, M., Lai, R., He, Z., Wu, Y., Zhang, K. 2008. *Heterorhabditoides chongmingensis* gen. nov., sp. nov. (Rhabditida: Rhabditidae), a novel member of the entomopathogenic nematodes. *Journal Invertebrate Pathology* 98: 153-168.

Zhang, K.Y., Liu, X.H., Tan, J., Wang, Y., Qiao, L., Yedid, G., Lai, R., and Gao, G.F. 2012. *Heterorhabditoides rugaroensis* n. sp (Rhabditida:Rhabditidae), a novel highly pathogenic entomopathogenic nematode member of Rhabditidae. *Journal of Nematology* 44:348–360.



Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 12 Febrero 2020

**COMITÉ DE REVISION DE TESIS**

Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez (Tutor)  
Dr. Juan Manuel Caspeta Mandujano (Co Tutor)  
Dr. Guadalupe Peña Chora  
Dr. Ramón Suárez Rodríguez  
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo  
Dr. Víctor López Martínez  
Dr. Alfredo Jiménez Pérez

Tesis: "Aislamiento, identificación y evaluación de tres cepas de nemátodos entomopatógenos en cultivos de caña de azúcar en Morelos"

Alumno que la presenta a revisión: **IVETH DEL ROCIO CASTRO ORTEGA**

Programa: **DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES**

**VOTO**

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

ATENTAMENTE

  
DR. ALFREDO JIMENEZ PEREZ



Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 12 febrero 2020

**COMITÉ DE REVISION DE TESIS**

Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez (Tutor)  
Dr. Juan Manuel Caspeta Mandujano (Co Tutor)  
Dr. Guadalupe Peña Chora  
Dr. Ramón Suárez Rodríguez  
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo  
Dr. Víctor López Martínez  
Dr. Alfredo Jiménez Pérez

Tesis: "Aislamiento, identificación y evaluación de tres cepas de nemátodos entomopatógenos en cultivos de caña de azúcar en Morelos"

Alumno que la presenta a revisión: **IVETH DEL ROCIO CASTRO ORTEGA**

Programa: **DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES**

**VOTO**

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

**ATENTAMENTE**

**DR. GUADALUPE PEÑA CHORA**



Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 12 de febrero 2020

### COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez (Tutor)  
Dr. Juan Manuel Caspeta Mandujano (Co Tutor)  
Dr. Guadalupe Peña Chora  
Dr. Ramón Suárez Rodríguez  
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo  
Dr. Víctor López Martínez  
Dr. Alfredo Jiménez Pérez

Tesis: "Aislamiento, identificación y evaluación de tres cepas de nemátodos entomopatógenos en cultivos de caña de azúcar en Morelos"

Alumno que la presenta a revisión: **IVETH DEL ROCIO CASTRO ORTEGA**

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

### VOTO

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

ATENTAMENTE

DR. JOSÉ AUGUSTO RAMÍREZ TRUJILLO





Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 12 Febrero 2020

**COMITÉ DE REVISION DE TESIS**

Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez (Tutor)  
Dr. Juan Manuel Caspeta Mandujano (Co Tutor)  
Dr. Guadalupe Peña Chora  
Dr. Ramón Suárez Rodríguez  
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo  
Dr. Víctor López Martínez  
Dr. Alfredo Jiménez Pérez

Tesis: "Aislamiento, identificación y evaluación de tres cepas de nemátodos entomopatógenos en cultivos de caña de azúcar en Morelos"

Alumno que la presenta a revisión: **IVETH DEL ROCIO CASTRO ORTEGA**

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

**VOTO**

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

ATENTAMENTE

DR. RAMON SUAREZ RODRIGUEZ



Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 12 febrero 2020

**COMITÉ DE REVISION DE TESIS**

Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez (Tutor)  
Dr. Juan Manuel Caspeta Mandujano (Co Tutor)  
Dr. Guadalupe Peña Chora  
Dr. Ramón Suárez Rodríguez  
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo  
Dr. Víctor López Martínez  
Dr. Alfredo Jiménez Pérez

Tesis: "Aislamiento, identificación y evaluación de tres cepas de nemátodos entomopatógenos en cultivos de caña de azúcar en Morelos"

Alumno que la presenta a revisión: **IVETH DEL ROCIO CASTRO ORTEGA**

Programa: **DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES**

**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 12 febrero 2020

**COMITÉ DE REVISION DE TESIS**

Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez (Tutor)  
Dr. Juan Manuel Caspeta Mandujano (Co Tutor)  
Dr. Guadalupe Peña Chora  
Dr. Ramón Suárez Rodríguez  
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo  
Dr. Víctor López Martínez  
Dr. Alfredo Jiménez Pérez

Tesis: "Aislamiento, identificación y evaluación de tres cepas de nemátodos entomopatógenos en cultivos de caña de azúcar en Morelos"

Alumno que la presenta a revisión: **IVETH DEL ROCIO CASTRO ORTEGA**

Programa: **DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES**

**VOTO**

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

**ATENTAMENTE**

**DR. JUAN MANUEL CASPETA MANDUJANO**



Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 12 febrero 2020

**COMITÉ DE REVISION DE TESIS**

Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez (Tutor)  
Dr. Juan Manuel Caspeta Mandujano (Co Tutor)  
Dr. Guadalupe Peña Chora  
Dr. Ramón Suárez Rodríguez  
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo  
Dr. Víctor López Martínez  
Dr. Alfredo Jiménez Pérez

Tesis: "Aislamiento, identificación y evaluación de tres cepas de nemátodos entomopatógenos en cultivos de caña de azúcar en Morelos"

Alumno que la presenta a revisión: **IVETH DEL ROCIO CASTRO ORTEGA**

Programa: **DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES**

**VOTO**

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

**ATENTAMENTE**

**DR. VICTOR LOPEZ MARTINEZ**