



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Instituto de Ciencias Agropecuarias

Centro de Investigación en Ciencia y
Tecnología de los Alimentos

**Aislamiento de nematodos nativos del Estado
de Hidalgo con potencial para el
control de plagas agrícolas**

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
Que para obtener el título de:

INGENIERO AGROINDUSTRIAL

PRESENTA:

Uriel Pérez Santos

Dirección: Dr. Norberto Chavarría Hernández
Co-dirección: Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández



UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

Dr. Carlos César Maycotte Morales
Director ICAP
PRESENTE

A través de este conducto le informamos atentamente que después de haber revisado el Trabajo de Investigación intitulado “**Aislamiento de nematodos nativos del estado de Hidalgo con potencial para el control de plagas agrícolas**” presentado por el pasante de Ingeniería Agroindustrial **Uriel Pérez Santos**, No. Cuenta 114149, consideramos que cumple con los elementos suficientes de contenido y forma para su réplica oral en el Examen Recepcional correspondiente. Por las razones anteriores otorgamos nuestra aprobación para la impresión del trabajo y continuación de los trámites necesarios por parte del pasante para que le sea asignada fecha de examen.

“AMOR, ORDEN Y PROGRESO”
Tulancingo de bravo, Hidalgo, a 17 de diciembre de 2008.

Atentamente

H. Comité Revisor

Dr. Norberto Chavarría Hernández

Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández

Dra. María Isabel Reyes Santamaría

Dra. Blanca Rosa Rodríguez Pastrana

Three handwritten signatures are present, each written over a horizontal line. The top signature is in dark ink and appears to be 'Rodríguez'. The middle signature is in dark ink and appears to be 'Reyes'. The bottom signature is in dark ink and appears to be 'Pastrana'.

c.c.p. Dr. Otilio Arturo Acevedo Sandoval, *Coordinación de la División de Investigación y Posgrado.*
M en C. María Teresa Flores Sotelo, *Dirección Regional del CONACyT, Zona Sur Oriente.*

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Instituto de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, bajo la dirección de los profesores: Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández y Dr. Norberto Chavarría Hernández. El trabajo forma parte de las actividades de los proyectos: Fondos Mixtos-CONACyT-Gobierno del Estado de Hidalgo-2006, Clave 48556, ***Catálogo de nematodos entomopatógenos nativos del Estado de Hidalgo, con potencial para ser empleados en el biocontrol de plagas y así contribuir a la disponibilidad de alimentos inocuos***; y PIFI-PROMEPA de Cuerpos Académicos 2006, ***Consolidación del Cuerpo Académico de Biotecnología Agroalimentaria***.

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas a las que me gustaría agradecer su amistad, apoyo, ánimo y compañía en las diferentes etapas de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y el corazón. Sin importar en dónde estén quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones.

Agradezco de manera especial a la Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández y al Dr. Norberto Chavarría Hernández por sus enseñanzas, asesoría y amistad, que hicieron posible la realización de este trabajo.

A los integrantes de la Comisión Revisora por sus observaciones y sugerencias.

A mis compañeros (en su momento) del Cuerpo Académico de Biotecnología Agroalimentaria por su apoyo y valiosa participación, Gabriela M., Nalle P., Eduardo O., Alejandro M. y Alan G., muchas gracias.

A mis compañeros de generación por su apoyo y consejos y a catedráticos que influyeron en mi formación profesional

A Yoselín Márquez y su familia por el apoyo y amistad que me brindaron en todo momento, muchas gracias.

Se agradece al Dr. Jorge E. Ibarra R. y a su grupo de trabajo, Ma. de Jesús Ortega E., Pedro Antonio N., M. en C. Elia Regina Basurto R., del Departamento de Biotecnología y Bioquímica del CINVESTAV unidad Irapuato, Guanajuato. A la QFB Sirenia González Pozos de la Unidad de Microscopía Electrónica del CINVESTAV unidad Zacatenco, México, por la colaboración brindada.

El camino ha sido duro y difícil, lleno de subidas y bajadas, pero los logros obtenidos y el apoyo recibido han permitido mantener el rumbo trazado, a todos GRACIAS.

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico a mi familia, especialmente a ti mamá y papá.

Mamá, gracias por todo, todo todo todo todo lo que has hecho por mi. Eres en pocas palabras la mejor mamá del mundo y gracias a ti, estoy dónde estoy. Siempre has estado conmigo en las buenas y en las malas, por eso te dedico este trabajo en agradecimiento al gran esfuerzo que has hecho por nosotros, tus hijos, para sacarnos adelante. Gracias mil gracias mamá y que Dios te bendiga.

Papá, al igual que a mamá te doy las gracias por todo, y antes que nada les agradezco a los dos por haberme traído a este mundo. Estoy agradecido contigo porque a pesar de los pesares, siempre me apoyaste. Te dedico este trabajo como símbolo de agradecimiento hacia ti. Gracias papá y cuídate mucho, que Dios te bendiga.

Marco, Chavo, Martha y Carmen, mis hermanos!!!!, ustedes siempre me han apoyado, espero que con este trabajo pueda remunerarles un poco de lo mucho que han hecho por mi. Se los dedico con mucho cariño, y así como se que cuento con ustedes, quiero que ustedes cuenten conmigo para lo que sea. Los quiero, cuídense mucho. Que Dios los bendiga.

Cuñados, Alma, Yuri y Fortino, gracias por los consejos y apoyo incondicional, les dedico este trabajo. Cuidense y saben que cuentan conmigo. Que Dios los bendiga.

Para mis sobrinos también hay dedicatoria, porque los quiero mucho y porque quieren mucho a su tío Uri.

Y hablando de tíos, tío Eloy, me has apoyado, has apoyado a mi familia, y ahorita la única manera en la que puedo agradecerte es diciéndote que también te dedico este trabajo. Muchas gracias, que Dios te bendiga al igual que a tu familia.

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ABREVIATURAS	viii
UNIDADES	ix
RESUMEN	1
Capítulo 1 REVISIÓN DE LITERATURA	2
1.1 Agricultura	2
1.1.1 Importancia	2
1.1.2 Producción	3
1.1.3 La agricultura orgánica y el medio ambiente	3
1.2 Control biológico de plagas para una agricultura sustentable	5
1.2.1 Manejo integrado de plagas	5
1.3 Nemátodos entomopatógenos como agentes de control biológico	6
1.3.1 Taxonomía de los nemátodos entomopatógenos	6
1.3.2 Distribución geográfica e importancia de la biodiversidad de los nemátodos entomopatógenos	7
1.3.3 Ciclo biológico	8
1.3.4 Producción masiva de JI (medios de producción y empresas que lo hacen)	10
1.3.4.1 Producción <i>in vivo</i>	12
1.3.4.2 Producción <i>in vitro</i> (Cultivo sólido)	12
1.3.4.3 Producción <i>in vitro</i> (Cultivo líquido)	13
1.4 Antecedentes del aislamiento e identificación de nemátodos entomopatógenos	15
1.4.1 Aislamiento de nemátodos entomopatógenos	15
1.4.2 Identificación de nemátodos entomopatógenos	18
1.4.2.1 Microscopia de Campo Claro (MCC)	18

1.4.2.2	Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)	19
1.4.2.2.1	Descripción de la Familia Steinernematidae	19
1.4.2.3	Evaluación morfométrica de los nemátodos entomopatógenos	21
1.4.2.4	Caracterización molecular	22
1.5	Justificación	26
1.6	Hipótesis	27
1.7	Objetivos	28
1.7.1	Objetivo general	28
1.7.2	Objetivos específicos	28
Capítulo 2	MATERIALES Y MÉTODOS	29
2.1	Ubicación de los sitios de recolección y de estudio de las muestras	29
2.2	Recuperación de nemátodos del suelo	30
2.2.1	Obtención de las muestras de suelo	30
2.2.2	Aislamiento de nemátodos entomopatógenos	30
2.3	Medición de los factores edafológicos	32
2.4	Identificación de nemátodos entomopatógenos	32
2.4.1	Microscopia de Campo Claro (MCC)	32
2.4.2	Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)	34
2.4.3	Caracterización morfométrica	35
2.4.4	Caracterización molecular	35
Capítulo 3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
3.1	Determinación y distribución de los nemátodos entomopatógenos	41
3.2	Factores edafológicos	46
3.2.1	pH del suelo	46
3.2.2	Humedad del suelo	48
3.3	Identificación de nemátodos entomopatógenos	50
3.3.1	Evaluación morfológica	51
3.3.1.1	Microscopia de Campo Claro (MCC)	51
3.3.1.2	Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)	56
3.3.2	Morfometría	59
3.3.3	Caracterización molecular	65
Capítulo 4	CONCLUSIONES	69

Capítulo 5	RECOMENDACIONES PARA TRABAJOS FUTUROS	71
Capítulo 6	ANEXOS	72
Capítulo 7	REFERENCIAS	79

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Principales plagas agrícolas susceptibles a nemátodos entomopatógenos en algunos cultivos (modificado de Bioagro, 2008)	7
Cuadro 2	Producción de nemátodos entomopatógenos en Europa y EUA en el 2004 (Kaya et. al, 2006)	11
Cuadro 3	Algunas investigaciones importantes relacionadas con la biogeografía de especies de nemátodos entomopatógenos (modificado de Hominick, 2002)	16
Cuadro 4	Técnicas básicas para el aislamiento de nemátodos entomopatógenos del suelo: ventajas y desventajas (Hominick, 2002)	18
Cuadro 5	PCR primers usados en taxonomía molecular de nemátodos entomopatógenos	25
Cuadro 6	Nemátodos entomopatógenos aislados en distintas locaciones del Estado de Hidalgo	44
Cuadro 7	Abundancia de NEP's y humedad de suelos donde fueron aislados	50
Cuadro 8	Morfometría fases Juveniles infectivas del NEP NH-1S aislado en la barranca de Metztitlán, Alcholoya, Hidalgo	59

Cuadro 9	Morfometría de JI de <i>Steinernema carpocapsae</i> (longitudes y proporciones en μm)	63
Cuadro 10	Homología con base a las secuencias del NEP NH-1S amplificadas, con las reportadas en base de datos del GEN BANK del NCBI	67
Cuadro 11	Concentración recomendada de gel de agarosa para separar moléculas de ADN lineales	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo de vida generalizado de nemátodos de los género <i>Heterorhabditis</i> y <i>Steinernema</i> (Poinar, 1990)	10
Figura 2	Larva de la gran palomilla de la cera, <i>Galleria mellonella</i> muerta por infección de nemátodos entomopatógenos. Las fases infectivas recién emergidas rodean el cuerpo muerto de una larva	12
Figura 3	Producción <i>in vitro</i> de nemátodos entomopatógenos. Cultivo sólido (Tomado de Woodring y Kaya, 1988)	13
Figura 4	Producción <i>in vitro</i> de nemátodos entomopatógenos en cultivo líquido. A) reactor agitado mecánicamente y B) reactor agitado neumáticamente	14
Figura 5	Ejemplos de diferentes estadios de desarrollo de steinernemátidos: A) MEB. Cabeza de adulto de <i>S. anomali</i> (vista sublateral) mostrando seis papilas labiales, tres de las cuatro papilas cefálicas (tomado de Nguyen y Smart, 1993); B) MEB. Vulva de una hembra de <i>S. feltiae</i> (vista lateral) (tomado de Nguyen <i>et al.</i> , 2006); C) MEB. Región posterior de un macho de <i>S. anomali</i> (vista lateral) mostrando siete pares y una singular papila preanal, las dos puntas de las espículas (tomado de Nguyen y Smart, 1993); y D) MCC. de un JI (vista lateral) mostrando el largo de la cola (tomado de Nguyen <i>et al.</i> , 2006)	21
Figura 6	Estructura general de las fases JI de nemátodos <i>Steinernema</i> spp.: 1. <i>Longitud total</i> (LT); 2. <i>Anchura máxima</i> (AM) 3. <i>Distancia del extremo de la cabeza al poro excretor</i> (PE) 4. <i>Distancia del extremo de la cabeza al</i>	22

anillo nervioso (AN) 5. Longitud del esófago (LE) 6. Longitud de la cola (LC) (García-del Pino, 1994)

- Figura 7** Muestras de suelos del Estado de Hidalgo, almacenadas en botes transparentes de 1 L 30
- Figura 8** Trampa de White (1927). Larvas infectadas probablemente por nemátodos entomopatógenos aislados en muestras de suelo del Estado de Hidalgo 31
- Figura 9** Diagrama del procesamiento de nemátodos en glicerina, para su observación en el microscopio de campo claro (Tomado de Kaya y Stock, 1997) 33
- Figura 10** Larvas de *Galleria mellonella* en muestras de suelo del Estado de Hidalgo, señaladas con flechas, durante aislamiento de nemátodos entomopatógenos 42
- Figura 11** Larvas de *Galleria mellonella* infectadas probablemente con NEP's presentes en suelos del Estado de Hidalgo. A) larvas muertas por el complejo *Steinernema* spp./*Xenorhabdus* spp. B) larvas muertas por el complejo *Heterorhabditis* spp./*Photorhabdus* spp 43
- Figura 12** Mapa del Estado de Hidalgo que muestra los sitios de muestreo donde dieron positivos los aislamientos de nemátodos entomopatógenos: ● aislamiento de steinernemátidos, ● aislamiento de heterorhabdítidos 46
- Figura 13** pH de las muestras de suelo donde se aislaron steinernemátidos y heterorhabdítidos en el Estado de Hidalgo 47
- Figura 14** % Humedad en base seca de muestras de suelos del estado de Hidalgo donde se aislaron steinernemátidos y heterorhabdítidos 49
- Figura 15** Familia Steinernematidae. A-D. Hembras de primera generación: A) microscopia electrónica de barrido (MEB) mostrando estoma abierto, papilas labiales y cefálicas; B) labios sobresalientes de la vulva (vista lateral); C) labios poco sobresalientes de la vulva (vista lateral); D) epiptygma. E) cola (vista lateral). F-H- Machos de primera generación: F) cola (vista lateral) mostrando singular papila ventral (flecha); G) MEB

de la cola mostrando papilas precloacal, adcloacal y postcloacal (vista lateral); H) cola (vista lateral) mostrando el mucron (flecha). I-M. Juveniles infectivos (JI): I) parte anterior mostrando el poro excretor (flecha); J) bolsa bacteriana (vista lateral) mostrando grupos de células bacterianas (flecha); K) y L) MEB de las bandas del campo lateral con (K) ocho y (L) seis líneas; M) cola (vista lateral) mostrando la porción hialina (flecha). (Escala de barras: A, L = 5.5 μm ; B, C, E, F = 25 μm ; D = 35 μm ; G = 40 μm ; H = 23.5 μm ; I, J = 16 μm ; K = 4 μm ; M = 10 μm) (Tomado de Stock y Hunt, 2005)

52

Figura 16 Aspecto de distintos estadios de desarrollo de steinernemátidos NH-1S aislados en el Estado de Hidalgo, bajo el microscopio de campo claro. A) hembra adulta de primera generación; B) macho adulto de primera generación, y C) infectivo juvenil (En todos los casos, 400 aumentos)

53

Figura 17 Aspecto de distintas estructuras de algunos estadios de desarrollo de steinernemátidos NH-1S aislados en el Estado de Hidalgo, bajo el microscopio de campo claro. Hembra adulta de primera generación, A) región anterior, C) vulva (vista lateral), y E) región posterior (vista lateral) (400 aumentos). Macho adulto de primera generación, B) espícula (vista lateral) (1,000 aumentos). Fase IJ, D) región posterior o cola (vista lateral) mostrando la porción hialina (flecha), y F) región anterior (vista lateral) mostrando el poro excretor (flecha) (400 aumentos)

54

Figura 18 Aspecto de distintas estructuras de algunos estadios de desarrollo de *Steinernema cholashanense* bajo el microscopio de campo claro. B) región posterior de un macho mostrando espícula. C) vulva, y E) cola de hembra de primera generación (Tomado de Nguyen *et al.*, 2008)

55

Figura 19 Aspecto de distintas estructuras de algunos estadios de desarrollo de steinernemátidos NH-1S aislados en el Estado de Hidalgo, bajo el microscopio de barrido de electrones. Fases JI: A) región anterior mostrando las papilas cefálicas (pc), y B) región posterior mostrando el ano (a) y el fasmidio, región anterior (1,000 y 400 aumentos, respectivamente). Hembra adulta de primera generación: C) región

	anterior (vista lateral) mostrando labios fusionados (lb) y el poro excretorio (flecha), y D) región posterior mostrando la punta de la cola (vista lateral). Macho adulto de primera generación: E) región posterior (vista lateral) mostrando la espícula poco prominente (flecha) (probablemente debido a que el espécimen era aún joven) y el mucron (m), y F) región posterior (vista lateral) mostrando papilas precloacal, adcloacal y postcloacal (vista lateral)	57
Figura 20	Aspecto de distintas estructuras de algunos estadios de desarrollo de steinernemátidos visualizados mediante microscopia de barrido de electrones. A) Región anterior de fase IJ de <i>Steinernema guangdongense</i> mostrando la línea lateral (tomado de Qiu <i>et al.</i> , 2004). B) Región posterior de <i>S. riobrave</i> (tomado de Nguyen y Adams, 2003). C) Cola de una hembra joven de primera generación de <i>S. guangdongense</i> (tomado de Qiu <i>et al.</i> , 2004)	58
Figura 21	Infectivos juveniles de <i>S. carpocapsae</i> : A) Cola “normal”, cepa BVC 01; B) Cola “anormal”, cepa BVC 02 (Shishiniova <i>et al.</i> , 1998)	61
Figura 22	Geles de agarosa al 1% p/v del ADN aislado y amplificado, del NEP NH-1S. A) ADN aislado; B) ADN amplificado por PCR	65
Figura 23	Secuencias de fragmentos de ADN amplificados del nemátodo entomopatógeno NEP NH-1S aislado en la barranca de Metztlán, Alcholoya, Hidalgo. S1 , secuencia obtenida en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad, Irapuato, Guanajuato; S2 , secuencia obtenida en el Centro de Investigación de Recursos Naturales (CIRN) de la Universidad de Azores, Portugal (el material genético usado en esta secuenciación se obtuvo mediante PCR usando los primers 18S y 26S de Vrain <i>et al.</i> , 1992)	67
Figura 24	Escalera de 1Kb de ADN, GIBCO BRL. Representación del marcador usado, que expresa el número de pares de bases correspondientes para cada banda	75

ABREVIATURAS

a	Año
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
AM	Anchura máxima
AN	Distancia del extremo de la cabeza al anillo nervioso
BLAST	Programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local
CiCyTA	Centro de investigaciones en Ciencia y Tecnología de los Alimentos
CINVESTAV	Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
CIRN	Centro de Investigación de Recursos Naturales
DE	Desviación estándar
dNTP's	Nucleótidos
ED	Extracción directa
EDTA	Dihidrato del Ácido Etilendiamino Tetraacético Disódico
EUA	Estados Unidos de América
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
GN	Género
GT	Trampa usando <i>Galleria mellonella</i>
IPN	Instituto Politécnico Nacional
ITS	Espaciadores internos transcritos
JI	Juvenil Infeccioso
LC	Longitud de la cola
LE	Longitud del esófago
LT	Longitud total
m	Mucron
MCC	Microscopía de campo claro
ME	Microscopio electrónico

MEB	Microscopia electrónica de barrido
n	Número de muestras
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica
NEP	Nemátodo entomopatógenos
NEP`s	Nemátodos entomopatógenos
NR	No reportado
OI	Otro insecto cebo
p	Fasmidio
PBS	Buffer de fosfatos
pc	Papilas cefálicas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Distancia del extremo de la cabeza al poro excretor
rDNA	ADN ribosomal
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SIAP	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera
S1	Secuencia 1
S2	Secuencia 2
TAE	Tris-acetato
TAF	Solución fijadora
TBE	Tris-borato
TPE	Tris-fosfato
Tris-HCl	Tris (Hidroximetil) Aminometano Clorhidrato
U.V.	Luz ultra violeta

UNIDADES

cm	Centímetro
d	Día
g	Gramo

h	Hora
kb	Kilobase
kDa	Kilodaltons
kg	Kilogramo
L	Litro
M	Molar
m ²	Metros cuadrados
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
pb	Pares de bases
pH	Potencial de iones hidrógeno
p/p	Unidades de peso por unidades de peso
p/v	Unidades de peso por unidades de volumen
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
Ton	Tonelada
V	Volt
v/v	Unidades de volumen por unidades de volúmenes
μL	Microlitro
μm	Micrómetros
°C	Grados Celsius
<	Menor que
≤	Menor o igual que
>	Mayor que
≥	Mayor o igual que
%	Porcentaje (por cien)



RESUMEN

El presente estudio se ocupa del aislamiento e identificación de nemátodos entomopatógenos en el Estado de Hidalgo. Se colectaron 165 muestras de suelo provenientes de la Sierra de Tenango, Valle de Tulancingo, Comarca Minera, Altiplanicie Pulquera, Cuenca de México y Valle del Mezquital, que fueron sometidas a bioensayos con la polilla mayor de la cera, *Galleria mellonella*, como insecto cebo, para determinar la presencia de nemátodos entomopatógenos (NEP's). El porcentaje de abundancia de NEP's fue del 23%, correspondiente a 38 muestras de suelo que dieron prueba positiva (42.1% de los aislados pertenecen al género *Steinernema* y 57.9% a *Heterorhabditis*).

Nemátodos steinernemátidos y heterorhabdítidos fueron encontrados en suelos tanto ácidos como alcalinos ($3.68 < \text{pH} < 7.95$ y $4.91 < \text{pH} < 8.49$ respectivamente). Por otro lado, respecto a los porcentajes de humedad de los suelos, el % de abundancia de NEP's del género *Steinernema* fue mayor en suelos con humedad $\leq 10\%$ y $> 21\%$, mientras que para el género *Heterorhabditis* sólo se encontraron NEP's en muestras con humedad $> 11\%$. En suelos con humedad $\leq 10\%$ no se evidenció la presencia de heterorhabdítidos.

Mediante el análisis de resultados morfológicos (basados en microscopia de campo claro y de barrido de electrones), morfométricos y moleculares (basados en la amplificación por PCR de la secuencia de ADN de la región del espacio interno transcrito), se logró la identificación del nemátodo entomopatógeno -NEP NH-1S, aislado en la barranca de Metztlán, Alcholoaya, Hidalgo- perteneciente a la especie *Steinernema carpocapsae*.



Capítulo 1

REVISIÓN DE LITERATURA

1.1 Agricultura

1.1.1 Importancia

La agricultura mundial ha conseguido grandes logros en los últimos 50 años pero en la actualidad se enfrenta a graves problemas a los que también tendrá que hacer frente en las próximas décadas, como el reciente aumento de los precios de los productos debido a una serie de contracciones en la producción causadas por las condiciones climáticas y a otros factores tales como la gran demanda de productos agrícolas para producir los nuevos biocombustibles. El crecimiento agrícola contribuye directamente a la seguridad alimentaria, pero también favorece la reducción de la pobreza y actúa como motor del crecimiento económico general en gran parte del mundo en desarrollo (FAO, 2007). En México, la agricultura está conformada por una sociedad rural que basa su vida y trabajo en el aprovechamiento primario de los recursos naturales para producir alimentos para las familias mexicanas, proveer materias primas para el fortalecimiento de otros sectores económicos, generar divisas por su dinámica exportadora y, recientemente, se ha constituido en fuente potencial para la elaboración de bioenergéticos (SAGARPA, 2007).



1.1.2 Producción

El valor de la producción agrícola mundial (cultivos tanto alimentarios como no alimentarios y productos ganaderos) se ha triplicado prácticamente en términos reales desde 1961, lo que representa un aumento medio anual del 2.3%, superior al crecimiento global de la población (1.7% anual). La mayor parte de este aumento ha tenido su origen en los países en desarrollo, aunque también refleja el incremento de la proporción que representan los productos de alto valor, como aquellos obtenidos a partir de la ganadería y de la horticultura (FAO, 2007). Durante el periodo 2000-2006, en México, la producción de alimentos creció a una tasa anual de 2.4%, ligeramente superior a la de la economía (2.3%) y duplicó al índice poblacional (1.2%). La producción promedio en los últimos seis años superó en 16.6% a la alcanzada en los seis años anteriores. A nivel mundial, México es el primer productor de aguacate, limón, cebolla y semilla de cártamo; ocupa el segundo lugar en la producción de pimientos, chiles y papaya; el tercero en toronja, naranja, carne de pollo y habas; el cuarto en maíz y sorgo; el quinto lugar en espárragos, frijol seco, garbanzo, café verde, y mango; y el sexto en sandía, caña de azúcar y huevo de gallina (SAGARPA, 2007). Por otra parte, en el año 2008, el Estado de Hidalgo logró una producción agrícola de cinco millones 523 mil 234 Ton, que representó 725 mil 345 Ton menos que el ciclo anterior. Las producciones que mayor masa rindieron fueron forraje y básicos, como alfalfa, cebada y avena, y frutales, como café cereza, durazno, manzana, naranja y nuez (SIAP 2008).

1.1.3 La agricultura orgánica y el medio ambiente

Actualmente, la agricultura alimenta a más de 6,000 millones de personas y en las últimas décadas se han experimentado importantes incrementos de la productividad de la agricultura con la introducción de nuevas variedades y métodos de producción (Tilman *et al.*, 2002). La producción de bienes agrícolas ha generado cambios ambientales mundiales y locales que han tenido consecuencias



importantes en la salud y el bienestar del ser humano (Foley *et al.*, 2005). En muchos países, la agricultura es la principal forma de uso del suelo y los hábitats en tierras cultivadas representan un importante porcentaje de los hábitats naturales. Los enfoques actuales de la agricultura ecológica deben contemplar el manejo integrado de plagas, los sistemas integrados de nutrición de las plantas y los cultivos conservacionistas, así como la ecología de las plagas, de las plantas y del suelo. Al no utilizar sustancias sintéticas (por ejemplo, fertilizantes, plaguicidas y productos farmacéuticos), los agricultores orgánicos se ven obligados a restaurar el equilibrio ecológico natural porque las funciones del ecosistema son su principal insumo productivo. Por ejemplo:

- En muchos cultivos es posible mantener por debajo del nivel de daño económico una cantidad de plagas no específicas, que son económicamente perjudiciales para éstos; por ejemplo, el pulgón, el piojillo, la mosca blanca o los ácaros, mediante el uso de predadores y parasitoides que aparecen de manera natural o son introducidos intencionalmente.
- Los suelos con alta diversidad funcional de microorganismos, muy frecuentes tras décadas de agricultura orgánica, desarrollan propiedades que suprimen las enfermedades y permiten crear resistencia en las plantas.
- La restricción en el uso de insumos agropecuarios obliga a los agricultores a implementar técnicas preventivas apropiadamente. La prohibición de los herbicidas, por ejemplo, hace imposible ignorar los principios de la buena rotación de cultivos, ya que ello resultaría a largo plazo desastroso para los rendimientos y crearía problemas con las malezas (FAO, 2003).
- El uso intensivo de insecticidas químicos, puede afectar al medio ambiente en general y particularmente a la salud del agricultor y del consumidor, así como también a animales e incluso a insectos benéficos; produciendo un incremento de la resistencia a los mismos y dejando residuos indeseables en el ambiente (Stock, 1992; Torres-Sánchez *et al.*, 2004).



1.2 Control biológico de plagas para una agricultura sustentable

El uso de los organismos antagonistas, competidores, patógenos, parásitos o depredadores de insectos (enemigos naturales), para controlar a las poblaciones de insectos plagas, se denomina control biológico o biocontrol (Stock, 1992). En México las experiencias para el control biológico datan desde 1942, cuando se empezó a usar un himenóptero para controlar a la mosca prieta de los cítricos. Posteriormente, en 1961 se combatió a la mosca pinta o salivazo de los pastos (*Aeneolamia postica*) y a una plaga del algodón (*Antonina graminis*) usando un insecto depredador (*Zelus mubilais*) y dos parasitoides (*Anagirus antoninae* y *Dusmetia sanguani*). Desde entonces se producen principalmente insectos parasitoides y depredadores para estas aplicaciones, y se han integrado programas para el biocontrol de plagas en tomate, chile, berenjena, pepino, melón, alfalfa, algodón, arroz, caña de azúcar, cítricos, frijol, frutales, manzana, sorgo, soya y trigo (Torres-Sánchez *et al.*, 2004).

1.2.1 Manejo integrado de plagas

El manejo racional del suelo y de los procesos productivos está estrechamente ligado a las prácticas de control integrado de plagas. Es decir, si el agricultor no tiene nociones elementales sobre el manejo del suelo y de los procesos productivos, los errores que comete son, en parte, causales de brotes de plagas. El control integrado de plagas comprende una serie de alternativas en que se basa el manejo racional de los medios de producción dentro de un enfoque de equilibrio ecológico, de modo de minimizar los efectos perjudiciales que provoca la intervención del hombre sobre las tierras cultivadas (Stock, 1992). El agricultor debe estar suficientemente consciente del equilibrio biológico que se puede mantener entre organismos benéficos y perjudiciales, de modo de atenuar la multiplicación de éstos, y dejar como última instancia el empleo de un plaguicida tomando las debidas precauciones para no perjudicar el ambiente.



1.3 Nemátodos entomopatógenos como agentes de control biológico

Los nemátodos entomopatógenos (NEP's) son excelentes agentes de control biológico debido a sus características, es decir, poseen quimiorreceptores, buscan activamente a sus hospederos y los matan rápidamente (Kaya y Gaugler, 1993), son letales a un amplio rango de insectos de importancia económica (Cuadro 1), son seguros para mamíferos, invertebrados y plantas (Reyes-Hernández, 2003), tienen potencial de reciclado, compatibilidad con muchos agroquímicos (Grewal, 1999) y hasta hace poco tiempo estaban exentos de registro en varias regiones del mundo (Reyes-Hernández, 2003).

1.3.1 Taxonomía de los nemátodos entomopatógenos

De acuerdo con Blaxter *et al.* (1998), la ubicación taxonómica de las familias de NEP's es la siguiente:

Phylum	Nematoda
Clase	Secernentea
Orden	Rhabditida
Suborden	Rhabditina
Superfamilia	Rhabditoidea
Familia	Steinernematidae Heterorhabditidae

La familia Steinernematidae contiene al género *Steinernema* que presenta las especies: *cubanum*, *arenarium*, *puertoricense*, *longicaudum*, *rarum*, *ritteri*, *scapterisci*, *carpocapsae*, *kushidai*, *riobrave*, *bicornutum*, *ceratophorum*, *neocurtillae*, *affine*, *intermedium*, *feltiae* y *kraussej*, además del género *Neosteinernema* con la especie *longicurvicauda*. La familia Heterorhabditidae contiene el género *Heterorhabditis* con las especies: *megidis*, *brevicaudus*, *hawaiiense*, *argentinense*, *indica*, *marelatus*, *bacteriophora* y *zealandica* (Hominick *et al.*, 1997).



Cuadro 1. Principales plagas agrícolas susceptibles a nemátodos entomopatógenos en algunos cultivos (modificado de Bioagro, 2008)

Nemátodo	Plaga	Cultivo
<i>Steinernema</i> sp.	<i>Premnotrypes vorax</i> (Coleóptera) / Gusano blanco de la papa	Papa, Nabo, Rábano
<i>Steinernema</i> sp.	<i>Spodoptera frugiperda</i> (Lepidóptera) / Gusano cogollero del maíz	Maíz, Arroz, Sorgo, Trigo, Caña, Pastos
<i>Steinernema</i> sp.	<i>Oxydia trychiata</i> Guenée (Lepidóptera) / Gusano medidor	Forestales (Ciprés, Pino, Café)
<i>Steinernema</i> sp.	<i>Metamasius hemipterus sericeus</i> (Coleóptera)/ Picudo rayado de la caña de azúcar	Caña, Plátano, Palma, Piña
<i>Heterorhabditis</i> sp.	<i>Hypothenemus hampei</i> (Coleóptera) / Broca del café	Café
<i>Steinernema</i> sp.	<i>Sagalassa valida</i> Walker (Lepidóptera) / Barrenador de la raíz	Palma
<i>Heterorhabditis</i> sp.	<i>Compsus</i> spp. / Picudo de los cítricos	Cítricos
<i>Heterorhabditis</i> sp.	<i>Phyllophaga</i> spp., <i>Anomala</i> spp. / Chisa, Mojojoy, Gallina ciega	Hortícolas, flores, plátano, maracuyá, café
<i>Steinernema</i> sp.	<i>Ceratitis capitata</i> , <i>Anastrepha ludens</i> .	Frutales, Plantas de tratamiento y producción de alimentos
<i>Heterorhabditis</i> sp.	Mosca de la fruta	
<i>Steinernema</i> sp.	<i>Musca domestica</i> L. (Dip.: Mus.)/ Mosca casera	Rellenos sanitarios, porquerizas, galpones, establos
<i>Steinernema</i> sp.	<i>Boophilus</i> spp. / Garrapatas	Ganado vacuno, establos
<i>Heterorhabditis</i> sp.		

1.3.2 Distribución geográfica e importancia de la biodiversidad de los nemátodos entomopatógenos

Los NEP's se encuentran en gran parte del mundo, se les ha localizado en todos los continentes, excepto en la Antártica (Kaya, 1987); así como de regiones sub-árticas hasta climas tropicales (Poinar, 1990; Liu y Berry, 1995; Hominick *et*



al., 1996); en las regiones muy frías, han tenido la capacidad de establecerse en condiciones de temperatura bajo cero, como es el caso de algunos steinernemátidos aislados en regiones de Canadá (Mracek y Webster, 1993). De igual manera se han aislado de regiones áridas, como el desierto de Negev en Israel (Lozano-Gutiérrez, 2001). El número de microorganismos usados como agentes de control biológico de insectos cada día aumenta y se diversifica, al utilizar distintos géneros y especies aisladas de diferentes regiones, por lo que es importante la utilización de organismos nativos, que son más eficaces porque están adaptados a las condiciones ambientales de las regiones de las cuales se aislaron y de esa forma se evita introducir al ecosistema especies exóticas (Torres-Sánchez *et al.*, 2004) (por ejemplo, especies que se encuentran fuera de su área de distribución original o nativa; CONABIO, 2007) que pueden estar relacionadas con la extinción de otras especies. En este sentido, la introducción de especies exóticas ocupa el segundo lugar en importancia después de la destrucción del hábitat.

1.3.3 Ciclo biológico

Los ciclos de vida de nemátodos entomopatógenos de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis* son muy similares, sin embargo estas similitudes son el resultado de una evolución convergente (Poinar, 1993) que de acuerdo a evidencias moleculares no indican una relación filogenética estrecha entre las dos familias (Blaxter *et al.*, 1998). El ciclo de vida de las especies del género *Steinernema* comprende un estado de huevo, cuatro estadios juveniles y un estado adulto (machos y hembras) (Poinar, 1990). Generalmente ocurren dos generaciones completas dentro del insecto hospedero. El tercer estadio conocido como juvenil infectivo (JI) es el que localiza al hospedero al detectar productos de excreciones, niveles de dióxido de carbono y gradientes de temperatura (Wright y Perry, 2002). La entrada del JI en el insecto hospedero ocurre a través de las aberturas naturales, boca, ano y espiráculos, o a través de las partes suaves del integumento en el caso de los JI heterorhabdítidos ya que poseen un diente con el



que pueden raspar la cutícula y entrar directamente al hemocele de ciertos insectos (Woodring y Kaya, 1988). Cuando un JI entra en el hemocele del hospedero libera la bacteria asociada que puede ser *Xenorhabdus* spp. para *Steinernema* spp. y *Photorhabdus luminescens* para *Heterorhabditis* spp. (Poinar, 1990).

La bacteria simbiótica se multiplica rápidamente en la hemolinfa, afecta la respuesta inmunológica del insecto, produce una variedad de toxinas no específicas que finalmente causan la muerte del insecto por septicemia, generalmente dentro de un lapso de 24 a 48 h (Grewal, 2000). Los JI se alimentan de la bacteria y tejidos del hospedero, mudan a la cuarta etapa y luego se convierten en adultos machos y hembras de la primera generación. Las diferencias para el género *Heterorhabditis* es que los juveniles de la primera generación llegan a ser adultos hermafroditas, mientras que en la segunda generación, son adultos machos y hembras. Después de aparearse, la hembra pone huevos emergiendo la primera etapa juvenil que muda sucesivamente hasta adultos de la segunda generación (Nguyen y Smart, 1994). En el caso de steinernemátidos, los adultos de segunda generación copulan y producen huevos naciendo de éstos el primer estado juvenil, posteriormente mudan al segundo instar, cuando los nutrientes del hospedero se agotan, el segundo instar deja de comer "secuestrando" alrededor de 200 células de su bacteria simbiótica dentro de una porción ventricular del intestino, mudando al tercer instar y reteniendo la cutícula del segundo instar (Glazer, 2002). Después de la infección del insecto hospedero, los JI abandonan el cadáver en búsqueda de nuevos insectos huésped, que bajo condiciones ideales ocurre entre los seis y once días en steinernemátidos y doce y catorce días en los heterorhabdítidos (Woodring y Kaya, 1988). Los JI no se alimentan, sin embargo pueden vivir por varias semanas de las sustancias que tienen almacenadas como lípidos y glucógeno, y durante varios meses al entrar a un estado cercano al anhidrobiótico (Grewal, 2000). En la Figura 1 se muestra el ciclo de vida generalizado de heterorhabdítidos y



steinernemátidos, mostrando la primera y segunda generaciones de adultos en ambos casos.

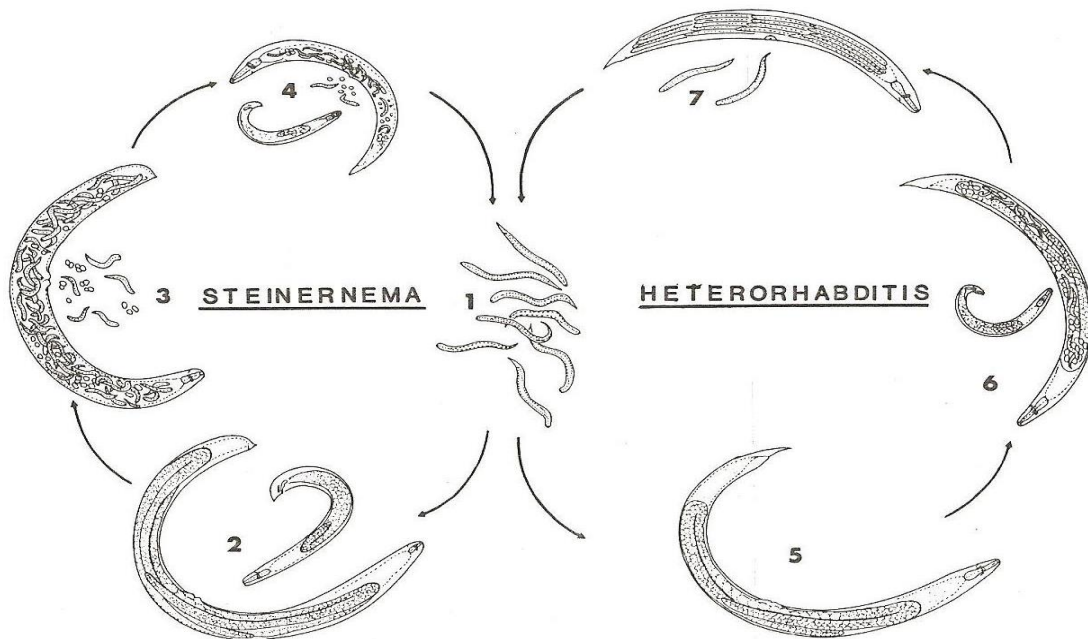


Figura 1. Ciclo de vida generalizado de nemátodos de los géneros *Heterorhabditis* y *Steinernema* (Poinar, 1990).

1.3.4 Producción masiva de JI (medios de producción y empresas que lo hacen)

En 2004 ocho productores de nemátodos entomopatógenos fueron notables en EUA y cinco en Europa (Cuadro 2). Las compañías que producen estos organismos realizan activamente fermentaciones de steinernemátidos o heterorhabdítidos para su venta. Las especies de nemátodos más comercializadas son: *Steinernema carpocapsae*, *S. feltiae*, *S. glaseri*, *S. kraussei*, *S. riobrave cabanillas*, *S. scapterisci*, *Heterorhabditis bacteriophora*, *H. indica*, *H. megidis* y *H. marelatus* (Kaya et al., 2006).

Los métodos *in vivo* son más apropiados para mantenimiento de cepas y producción de JI para ensayos de laboratorio y de campo a pequeña escala. Para las producciones a gran escala, los métodos *in vitro* son los más productivos (Islas-López et al., 2005).

**Cuadro 2.** Producción de nemátodos entomopatógenos en Europa y EUA en el 2004 (Kaya *et al.*, 2006)

Compañía	Nematodo	Sitio de internet	Formulación	Venta/uso
Andermatt Biocontrol Grossdietwil	Sc*, Sf, Hm	www.biocontrol.ch	Arcilla	Invernadero/Jardinería
Asa Jung Laboratory, Oaklan, California, E.U.	Sc, Sf	www.asajunglab.com	Arcilla	Varios
Biologic Willow Hill, Pennsylvania, E.U.	Sc, Sf	www.biologicco.com	Dispersable granular, esponja, granular	Varios
Bionema, Umea, Swenden	Sc, Sf, Sg	www.bionema.se /	Polímero	Jardinería, invernadero, cultivo
Becker Underwood Ames Iowa E.U.	Sk, Ss, Hm	www.beckerunderwood.com	Spray Dispersable granular	hongos, varios.
Certis Columbia. Maryland, E.U.	Sc, Sf, Sr	www.certisusa .com/ aboutcertis	Arcilla, polímero	Invernadero, cultivo hongos, jardinería, viveros.
e-nema GmbH Raisdorf Germany	Sc, H sp.	www.hydro-gardens.com	Esponja	Invernadero
Biocontrol integral, Greendale, Indiana, E.U.	Hb, Hi, Hmar	www.goodbug-shop.com	Pasta, esponja	Cítricos, césped, etc.
Kooper, Berkel en Rodenrijs, Holanda	Sf, Hb	www.koppert.nl	Arcilla	Invernaderos, césped.
M y R Durango, Bayfield, Colorado E.U.	Sc, Sf, Hb	www.goodburg.com	Esponja	Varios
Owinplant, Owinska K/Poznania Polonia	Sf	www.owinplant.com.pl	Arcilla	Invernaderos, Cultivo de hongos

Antes del 2003 Canadá producía, pero no muestra actividad desde el año 2004.

*Sc = *Steinernema carpocapsae*; Sf = *S. feltiae*; Sg = *S. glaseri*; Sk = *S. kraussej*; Sr = *S. riobrave*; Ss = *S. scapterisci*; Hb = *Heterorhabditis bacteriophora*; Hi = *H. indica*; Hm = *H. megidis*; Hmar = *H. marelatus*.



1.3.4.1 Producción *in vivo*

Para este tipo de producción se utiliza frecuentemente la gran palomilla de la cera, *Galleria mellonella* (Figura 2) por ser de fácil adquisición, reproducidas con pocos recursos y ser un hospedante muy susceptible. La producción promedio de JI por larva de insecto oscila entre 30,000 y 50,000 JI (Shapiro-Ilan y Gaugler, 2002).



Figura 2. Larva de la gran palomilla de la cera, *Galleria mellonella* muerta por infección de nemátodos entomopatógenos. Las fases infectivas recién emergidas rodean el cuerpo muerto de una larva.

1.3.4.2 Producción *in vitro* (Cultivo sólido)

La producción en cultivo sólido surgió como una necesidad de hacer más económica y productiva la obtención de nemátodos. Los factores importantes son: que el cultivo sea monoxénico (por ejemplo, los nemátodos y su bacteria asociada sean los únicos agentes bióticos), el uso de la fase I bacteriana, una superficie grande para que los nemátodos puedan crecer, una fuente de esteroides para los nemátodos y una base alimentaria para las bacterias (Shapiro-Ilan y Gaugler, 2002). El método más famoso es el de Bedding (1984) que utiliza como medio de cultivo un homogenato de vísceras de aves y como soporte, placas de poliuretano colocados en frascos de vidrio (Figura 3) o bolsas que pueden ser procesadas en



el autoclave. El proceso puede ser semi-automatizado, aunque sus críticos le señalan problemas en su estabilidad de producción, por la inconsistencia de los materiales usados y de fácil contaminación (Shapiro-Ilan y Gaugler, 2002).



Figura 3. Producción *in vitro* de nemátodos entomopatógenos. Cultivo sólido (Tomado de Woodring y Kaya, 1988).

1.3.4.3 Producción *in vitro* (Cultivo líquido)

En la producción por fermentación en medio líquido se realizan cultivos monoxénicos y es la tecnología preferida para la producción comercial a gran escala. Tiene muchos aspectos positivos, aunque por ser objeto de patentes de las firmas comerciales, la información está restringida. Así tenemos que son de fácil escalamiento, confiabilidad, empleo de materiales estables y uniformes; sin embargo se conoce que con los steinernemátidos está más adelantada su



producción y se producen corrientemente, incluso en fermentadores de 80 mil litros (Gaugler, 1988). Estos procesos involucran dos etapas, la producción de la bacteria asociada seguida del desarrollo de nemátodos, que se inoculan en un momento dado durante los bioprocesos. Para la formulación de medios se han usado homogenatos de riñón y extracto de levadura (Shapiro-Ilan y Gaugler, 2002), o medios conteniendo, aceite de maíz, yema de huevo y agua-miel de agave, entre otros ingredientes, los cuales llegan a producir rendimientos tan altos como 200,000 JI/mL (Ortega-Morales, 2008). La Figura 4 muestra dos fermentadores típicos usados para la producción *in vitro* de nemátodos entomopatógenos en cultivo líquido sumergido. La agitación usada en estos fermentadores es del tipo mecánica (Figura 4A) y neumática (Figura 4B).

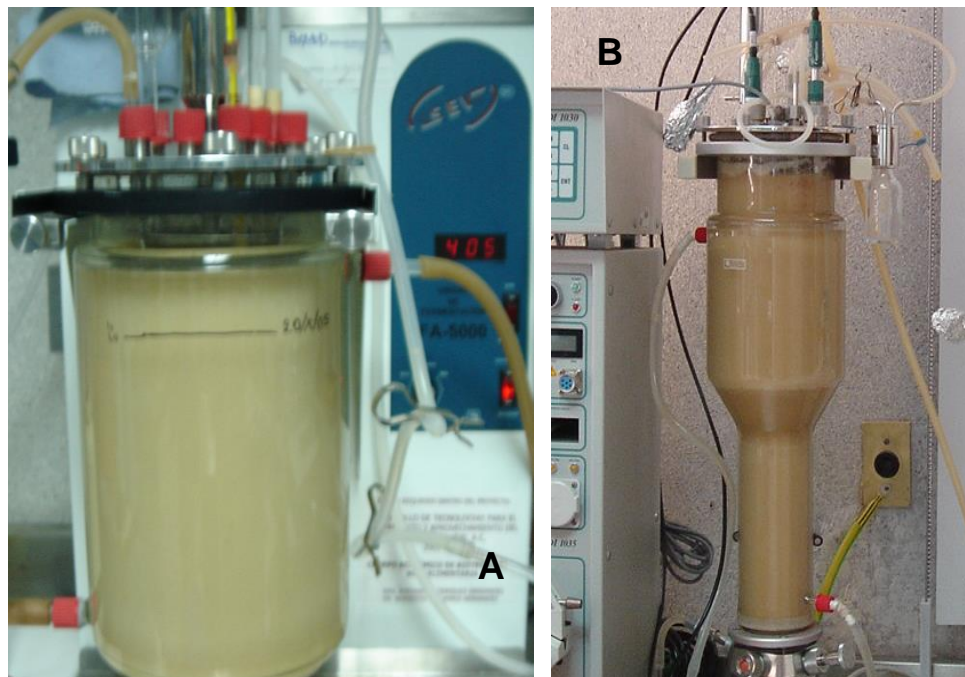


Figura 4. Producción *in vitro* de nemátodos entomopatógenos en cultivo líquido. A) reactor agitado mecánicamente y B) reactor agitado neumáticamente.



1.4 Antecedentes del aislamiento e identificación de nemátodos entomopatógenos

La dificultad de los esfuerzos para describir nuevas especies de nemátodos entomopatógenos es una laguna rápidamente disminuida por los taxonomistas. Para alguien que no es especialista, las diferentes especies de *Steinernema*, y especialmente *Heterorhabditis*, parecen similares. Aunque la excelente morfología basada en claves taxonómicas existe (Hominick *et al.*, 1997), la tarea de ordenar completamente muestras de nemátodos colectadas de campo y hacer de las especies los niveles de clasificación taxonómicos, puede ser frustrante. Recientes avances en biología molecular y teoría evolucionaria, mientras no sustituya a la pericia de un taxonomista, puede proveer registros de nemátodos con herramientas adicionales para la identificación, delimitación y representación de especies de nemátodos entomopatógenos (Adams y Nguyen, 2002). Varias descripciones recientes de especies integran datos morfológicos y genéticos moleculares (Stock *et al.*, 1998) (Cuadro 3). Las características moleculares pueden ser usadas para identificar, diagnosticar y delimitar especies en la misma forma como las características morfológicas. Una fortaleza de los datos moleculares es su base genética clara, una ventaja obligatoria dada la cantidad importante de ambientes y hospederos que inducen a la variación morfológica exhibida por los nemátodos entomopatógenos (Gaugler, 2002).

1.4.1 Aislamiento de nemátodos entomopatógenos

El aislamiento de nemátodos entomopatógenos del suelo puede resultar poco complicado si se usan técnicas convenientes (Hominick, 2002) (Cuadro 4), de manera que numerosos nemátodos pueden ser recuperados; por lo tanto, los especímenes entomopatógenos tienen que ser separados e identificados (Curran y Heng, 1992).



Cuadro 3. Algunas investigaciones importantes relacionadas con la biogeografía de especies de nemátodos entomopatógenos (modificado de Hominick, 2002)

Localidad	Método	Especie identificada	Comentarios	Referencia
Europa				
Irlanda	GT*	<i>S. feltiae</i> , <i>S. affine</i>	17/169 sitios positivos en pradera y bosque; <i>S. feltiae</i> en 12 sitios.	Dillon <i>et al.</i> , 2000
Suiza	GT	<i>S. intermedium</i> , <i>S. feltiae</i> , <i>S. kraussei</i> , <i>S. bicornutum</i> , <i>S. affine</i> , <i>S. carpocapsae</i> , <i>H. megidis</i> , <i>H. bacteriophora</i>	113/600 muestras positivas en tierras bajas; 104 con steinernemátidos, 6 con <i>H. megidis</i> , uno con <i>H. bacteriophora</i> .	Kramer <i>et al.</i> , 2000
Azores	GT*	<i>H. bacteriophora</i> , <i>S. carpocapsae</i> , <i>S. glaseri</i>	1180 sitios de 8 islas; 30 sitios con heterorhabdítidos, 16 con steinernemátidos.	Rosa <i>et al.</i> , 2000
Alemania	GT ED	<i>S. affine</i> , <i>S. intermedium</i> , <i>S. kraussei</i> , <i>S. feltiae</i>	Suelos de bosque; se comparó la eficiencia de dos métodos de extracción, resultando mejor el de ED.	Sturhan y Mracek, 2000
España, La Rioja	GT	<i>S. feltiae</i> , <i>S. kraussei</i> , <i>S. carpocapsae</i>	27/500 muestras de tierra. 20 identificados como steinernemátidos y 7 no identificados a nivel de especie.	Campos-Herrera <i>et al.</i> , 2007
Bélgica	ED	<i>S. feltiae</i> , <i>S. affine</i>	Presentan una distribución espacial de dos nemátodos entomopatógenos en pastizales.	Spiridonov <i>et al.</i> , 2007
América del Norte				
Zacatecas, México	GT	Heterorhabdítidos y steinernemátidos no identificados	36/72 sitios muestreados dieron positivo, de 33 localidades; 18 steinernemátidos y 22 heterorhabdítidos.	Salas-Luévano, 2002
Arizona, EU	GT	<i>S. riobrave</i> , <i>S. oregonense</i>	28/120 muestras de suelo; 22 con steinernemátidos y 6 con heterorhabdítidos.	Stock y Gress, 2006
América del Sur				
Argentina, región de la Pampa	GT	<i>S. feltiae</i> , <i>S. scapterisci</i> , <i>S. carpocapsae</i> , <i>H. bacteriophora</i> , <i>H. argentinensis</i>	41/310 muestras positivas en 14 localidades. Steinernemátidos, 66%; heterorhabdítidos, 34%.	Stock, 1995
Colombia	GT	<i>H. bacteriophora</i>	Encontrado en tres de ocho sitios.	Caicedo y Bellotti, 1996



Argentina	NR	<i>S. feltiae</i> , <i>S. scapterisci</i> , <i>S. carpocapsae</i> , <i>S. glaseri</i> , <i>S. rara</i> , <i>S. ritteri</i> , <i>H.</i> <i>bacteriophora</i>	Revisión de nemátodos entomopatógenos en agricultura de la Argentina continental.	Doucet y De Doucet, 1997
Venezuela	GT	<i>H. indica</i>	Principalmente evaluar nemátodos nativos en comparación con foráneos.	Rosales y Suárez, 1998
Asia				
Indonesia	GT OI	<i>H. indica</i> , dos <i>Steinernema</i> FRLP tipos	Muestreo en sitios prometedores; 16/79 sitios positivos, todos costeros; ambos géneros en igual frecuencia. Insectos trampa; <i>Galleria</i> , <i>Tenebrio molitor</i> y banboo.	Griffin <i>et al.</i> , 2000
Pakistan: Sindh y Balochistan	GT	<i>H. indica</i> , steinernemátidos y heterorhabdítidos no identificados	415 muestras, 15 localidades; 20 steinernemátidos y 31 heterorhabdítidos aislados, 23 <i>H. indica</i> .	Anis <i>et al.</i> , 2000
Palestina	NR	<i>H. indica</i>	Estudio molecular.	Sansour y Iraki, 2000
China, provincia de Sichuan	GT	<i>S. cholashanense</i> n. sp.	Una nueva especie.	Nguyen <i>et al.</i> , 2008
África				
Kenya	GT	<i>S. kari</i> , <i>H. bacteriophora</i> , <i>H. indica</i>	Entomopatógenos en 154/641.	Waturu, 1998
Australia/Océano Pacífico				
Hawaii	GT	Heterorhabdítidos y steinernemátidos no identificados	Primero en mostrar asociación de heterorhabdítidos en costas; 351 muestras de seis islas; 22 sitios con heterorhabdítidos, dos con steinernemátidos.	Hara <i>et al.</i> , 1991
Nueva Zelanda	GT	<i>S. feltiae</i> , <i>H. zealandica</i>	<i>S. feltiae</i> dominante.	Barker y Barker, 1998

*GT = Trampa usando *Galleria mellonella*; OI = Otro insecto cebo; ED = Extracción directa; NR = No reportado



La identificación de JI requiere particular experiencia taxonómica de modo que sólo unos pocos científicos son capaces de realizar la tarea. Una buena alternativa es usar un bioensayo (Hominick *et al.*, 1996) en el cual larvas de *Galleria mellonella* sirven como cebo para el aislamiento de NEP's (Woodring y Kaya, 1988).

Cuadro 4. Técnicas básicas para el aislamiento de nemátodos entomopatógenos del suelo: ventajas y desventajas (Hominick, 2002)

	Flotación	Embudo Baerman	Bioensayo
Actividad del nemátodo	Pasiva	Activa	Infectiva
Eficiencia	Alta	Baja	Muy baja
Población de nemátodos recuperados	Mezclada	Mezclada	Una
Labor requerida	Alta	Alta	Baja
Cultivos de laboratorio establecidos	No	Posible	Si
Estadios recuperados	Juveniles	Juveniles	Todos
Experiencia taxonómica requerida	Alta	Alta	Moderada
Posible trabajo taxonómico	No	No	Si
Cuantitativo	Si	Si	Si

1.4.2 Identificación de nemátodos entomopatógenos

Los NEP's aislados y con potencial de uso como agentes de control biológico, deben ser clasificados taxonómicamente y documentados apropiadamente. La identificación se logra mediante parámetros morfológicos estandarizados, que por sí solos, son raramente sencillos (Poinar, 1990).

1.4.2.1 Microscopia de Campo Claro (MCC)

Una herramienta esencial para la identificación de los nemátodos, lo constituye el estudio morfológico y el morfométrico de las especies (Rodríguez, 2001). Para ello se requiere realizar preparaciones para microscopia de campo



claro. La mayoría de las estructuras son mejor observadas en especímenes vivos, aunque su observación se limita solamente a 20 min. De ahí la importancia del sacrificio y fijación de los nemátodos para realizar este tipo de estudios (Hominick, 1997). La Figura 5D muestra la fotografía de un JI tomada bajo microscopio de campo claro, donde se puede apreciar muy bien la cola del espécimen.

1.4.2.2 Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)

La MEB es una herramienta muy usada para la visualización e interpretación de ciertas características de los nemátodos que no pueden ser apreciados con un microscopio de campo claro, pero ambas son importantes para la identificación taxonómica (Kaya y Stock, 1997). Para poder interpretar la MEB es necesario conocer la taxonomía de los nemátodos entomopatógenos. Las características principales consideradas en claves taxonómicas para la identificación de NEP's son: cápsula cefálica, región caudal, espícula, testículos y gubernáculo del macho (Lozano-Gutiérrez, 2001; Nguyen y Smart, 1996).

1.4.2.2.1 Descripción de la Familia Steinernematidae

Steiner (1923) aisló en Alemania el primer nemátodo steinernemátido y lo describió como *Aplectana kraussei*, en el orden Oxyurata. Según Steiner este nemátodo podía ser reconocido por "la falta de estructuras semejantes a valvas en el bulbo basal del esófago". Travassos (1927), en base a este carácter, colocó esta especie en un nuevo género *Steinernema*, pasando a ser *Steinernema kraussei* Steiner, 1923, la especie tipo de este nuevo género. Sin embargo la ausencia de estructuras semejantes a valvas en el bulbo basal era insuficiente para reconocer el género *Steinernema* y no se volvió a asignar ninguna especie a este género. En 1929, Steiner describió *Neoplectana glaseri*, y observó que en este género el bulbo terminal también es bastante tenue y la cadena de valvas es indistinguible. En base a estos caracteres designa a esta especie como especie



tipo del nuevo género *Neoaplectana* dentro del orden Oxyurata y cerca del género *Steinernema*.

A – Adultos: Los steinernemátidos presentan sólo generaciones anfimíticas encontrándose únicamente en el interior de los cadáveres de los insectos que parasitan. Poseen seis labios parcial o completamente fusionados; cada labio con una papila labial en su extremo. Se distinguen cuatro papilas cefálicas y dos anfidios laterales en ocasiones inconspicuos (Figura 5A). La cutícula es lisa. La cabeza es redondeada con el estoma parcialmente colapsado, y la porción posterior rodeada por tejido de la faringe. El anillo nervioso es conspicuo y generalmente rodeando al istmo de la faringe. El poro excretor es ventral siendo claramente distinguible. El campo lateral y los fasmidios son inconspicuos.

Hembras: Anfidelfas con ovarios opuestos retroflexos. La vulva presenta unos labios aparentes y está situada en la mitad del cuerpo (Figura 5B), siendo funcional durante el acoplamiento y durante el primer periodo de la ovoposición. La vagina se deteriora en las hembras mayores, las cuales se convierten en ovovivíparas. Las formas larvarias que eclosionan en el interior de las hembras consumen el contenido de su cuerpo provocando la muerte de las mismas. El tamaño de las hembras es variable en función de la calidad de alimento disponible.

Machos: Testículo simple, retroflexo. Las espículas son pares y separadas. El gubernáculo está presente, pero la bursa es ausente. Cola con o sin mucron (prolongación cuticular del extremo de la cola), presenta generalmente 23 papilas genitales (excepcionalmente 21) (Figura 5C). Los espermatozoides, de forma ameboide, comienzan su maduración en los testículos del cuarto estadio larvario.

B – Estadios infectivos (JI): Las formas infectivas son más estrechas que las demás formas juveniles parasíticas. La cola es puntiaguda (Figura 5D). La cutícula presenta de cuatro a ocho estriaciones longitudinales (bandas del campo lateral).

La boca y el ano están cerrados y la faringe e intestino colapsados. El poro excretor se encuentra en la región anterior del intestino.

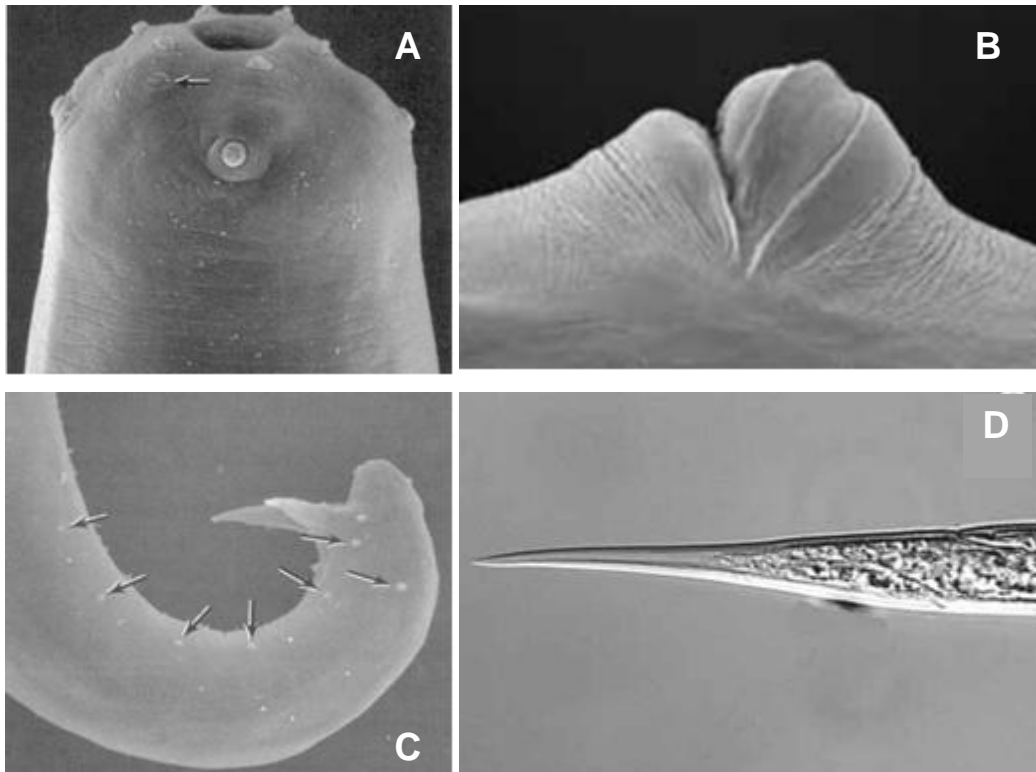


Figura 5. Ejemplos de diferentes estadios de desarrollo de steinernemátidos: A) MEB. Cabeza de adulto de *S. anomali* (vista sublateral) mostrando seis papilas labiales, tres de las cuatro papilas cefálicas (tomado de Nguyen y Smart, 1993); B) MEB. Vulva de una hembra de *S. feltiae* (vista lateral) (tomado de Nguyen *et al.*, 2006); C) MEB. Región posterior de un macho de *S. anomali* (vista lateral) mostrando siete pares y una singular papila preanal, las dos puntas de las espículas (tomado de Nguyen y Smart, 1993); y D) MCC. de un JI (vista lateral) mostrando el largo de la cola (tomado de Nguyen *et al.*, 2006).

1.4.2.3 Evaluación morfométrica de los nemátodos entomopatógenos

La morfometría de los infectivos juveniles de steinernemátidos es importante para la descripción e identificación de especies. Las mediciones de JI varían considerablemente dependiendo el tiempo en que son cosechados después de su primera aparición en cultivos *in vivo*, y si los nemátodos fueron criados in



vivo o *in vitro* (Nguyen y Smart, 1995). Las medidas morfométricas de JI del genero *Steinernema* que se usan para la identificación de estas especies son (Figura 6); el largo total del cuerpo (LT), largo total del cuerpo dividido por la anchura máxima del cuerpo (proporción "A"), largo total del cuerpo dividido por la longitud del esófago (proporción "B"), largo total del cuerpo dividido por la longitud de la cola (proporción "C"), distancia del extremo de la cabeza al poro excretor dividida por la longitud del esófago (proporción "D"), distancia del extremo de la cabeza al poro excretor dividida por la longitud de la cola (proporción "E") (Hominick, 1997).

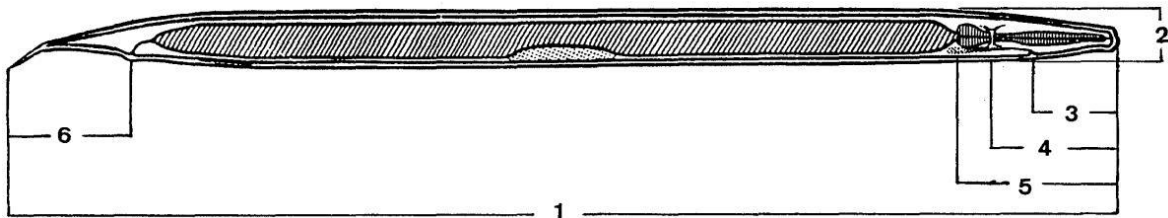


Figura 6. Estructura general de las fases JI de nemátodos *Steinernema* spp.: 1. Longitud total (LT); 2. Anchura máxima (AM) 3. Distancia del extremo de la cabeza al poro excretor (PE) 4. Distancia del extremo de la cabeza al anillo nervioso (AN) 5. Longitud del esófago (LE) 6. Longitud de la cola (LC) (García-del Pino, 1994)

1.4.2.4 Caracterización Molecular

Antes de la llegada de análisis filogenético molecular de nemátodos, el estudio sistemático del phylum Nematoda se vio obstaculizado por: (i) el número de especies y diversidad morfológica; (ii) las limitaciones de la microscopía de luz en el análisis de la morfología del nemátodo; y (iii) la inevitable especialización en sistemática de nemátodos. Cuando la mayoría de especies bajo estudio tienen menos de un par de milímetros en tamaño y los caracteres que han sido observados, en el mejor de los casos son difíciles de clasificar y definir en homología, el problema parece insoluble. Con el fin de poner un poco de claridad sobre el terreno, un indicador universal es necesario: una medida adoptada de cualquier especie que le permita ser comparada, utilizando métodos verificables,



con otras especies, y derivar información filogenética de la comparación. Los marcadores filogenéticos moleculares ofrecen tal solución (Blaxter, 2001). La identificación precisa de nemátodos (independientemente de la etapa de desarrollo) tiene implicaciones importantes para muchas áreas, incluyendo la sistemática (taxonomía y la filogenia), genética de poblaciones, ecología y epidemiología. A menudo los nemátodos son identificados y distinguidos individualmente a base de características morfológicas, el hospedero que infectan, sus patrones de transmisión, sus efectos patológicos en el hospedero o sus orígenes geográficos. Sin embargo, estos criterios son a menudo insuficientes para una identificación específica. Como alternativa, las técnicas inmunológicas, bioquímicas y de ácidos nucleicos proporcionan herramientas poderosas para superar esta limitación. En particular, el advenimiento del método de PCR ha revolucionado la taxonomía de nemátodos y la genética, principalmente debido a que su sensibilidad permite la amplificación de los genes o fragmentos de genes a partir de cantidades ínfimas de ADN genómico. Esto es de particular importancia porque es con frecuencia imposible de obtener o aislar cantidades suficientes de material de algunos cuantos nemátodos en sus diferentes fases del ciclo de vida (por ejemplo, huevos o larvas) por análisis convencionales. El método de PCR permite la amplificación selectiva de un genoma complejo por amplificación enzimática *in vitro* (Gasser, 2001).

En teoría, el genoma entero de un nemátodo puede ser sobre trazado para marcadores genéticos moleculares y así discriminar un rango taxonómico particular. Sin embargo, para facilitar la comparación, los marcadores que tienen la más grande representación en bases de datos genéticos son los puntos de partida más convenientes para investigar totalmente el estado taxonómico de un nemátodo entomopatógenos desconocido (Adams y Nguyen, 2002). La elección de una región meta o regiones para amplificación por PCR depende en cuestión a lo que esta dirigido y el propósito al que debería servir. En general, si la región meta debe proporcionar marcadores genéticos para la identificación de especies, entonces el nivel de variación en la secuencia dentro de las especies debería ser



sustancialmente menor que el grado de variación entre especies. Si la región debe proporcionar los marcadores para la identificación de las cepas, entonces un significativo nivel de variación de la secuencia debe existir dentro de las especies objeto de la investigación (Gasser, 2001).

El rDNA puede proporcionar marcadores genéticos útiles para estudiar especies de parásitos. Por ejemplo, estudios recientes (Cuadro 5) han demostrado que los espaciadores internos transcritos (ITS-1 e ITS-2) de rDNA proporcionan exactos marcadores de especies para una serie de nematodos (Gasser, 2001) los cuales pueden ser utilizados para desarrollar sistemas de diagnóstico basados en PCR. Para asignar el material a grupos de especies, el marcador molecular de elección para *Heterorhabditis* y *Steinernema* es la secuencia del ADN de la región del espacio interno transcrito del gen ribosomal seleccionado (ITS rDNA). Este marcador presenta la variación sólida entre especies de *Heterorhabditis* y *Steinernema* (Adams *et al.*, 1998; Szalanski *et al.*, 2000; Nguyen *et al.*, 2001).

Actualmente el uso de la biología molecular para la identificación de especies de nemátodos entomopatógenos es cada vez mas difundida, conjuntamente con técnicas morfológicas y morfométricas de uso tradicional. Por ejemplo, Nguyen *et al.* (2008) usaron microscopia de luz, microscopia electrónica de barrido, filogenética, e incluso esquemas a mano alzada, para representar la morfología del NEP objeto de estudio. Otros autores que han seguido estrategias similares en el estudio de NEP's son Phan *et al.* (2006), Qiu *et al.* (2004) y Stock *et al.* (1998), entre otros.

La mayoría de los trabajos relacionados con estos organismos se han realizado en países como China, Tailandia, Japón, Canadá, Estados Unidos, Argentina, por mencionar algunos. En contraste, en México sólo unos cuantos autores como Salas-Luévano (2002), Molina-Ochoa *et al.* (2003) y Lozano-Gutiérrez (2001) se han dado a la tarea de estudiar y tratar de identificar a NEP's silvestres.

**Cuadro 5.** PCR *primers* usados en taxonomía molecular de nemátodos entomopatógenos

Localidad	Especie identificada	Primer (forward y reverse)	Región	Fuente
Tailandia	Ssi*	18S y 26S (Vrain <i>et al.</i> , 1992)	ITS	Stock <i>et al.</i> , 1998
Japón	Sa	18S y 26S (Vrain <i>et al.</i> , 1992)	ITS	Phan <i>et al.</i> , 2006
Etiopía	Sy	18S y 26S (Vrain <i>et al.</i> , 1992)	ITS	Nguyen <i>et al.</i> , 2004
Norte del Cáucaso	Sb	18S y 26S (Vrain <i>et al.</i> , 1992), AB28 y TW81 (Joyce <i>et al.</i> , 1994)	ITS	Ivanova y Spiridonov, 2003
Vancouver, Canadá	Sf	18S y 26S (Vrain <i>et al.</i> , 1992), KN58 y KNRV (Nguyen <i>et al.</i> , 2001)	ITS	Nguyen <i>et al.</i> , 2006
Condado de Polk, Florida	Sd	AB28 y TW81 (Hominick <i>et al.</i> , 1997), KN58 y KNRV (Nguyen <i>et al.</i> , 2001)	ITS	Nguyen y Duncan, 2002
Sur de China	Sgu	18S y 26S (Nguyen <i>et al.</i> , 2001)	ITS	Qiu <i>et al.</i> , 2004
Provincia de Sichuan, China	Sch	18S y 26S (Vrain <i>et al.</i> , 1992), KN58 y KNRV (Nguyen <i>et al.</i> , 2001)	ITS, D2D3	Nguyen <i>et al.</i> , 2008

*Ssi = *S. siamkayai*; Sa = *S. ashiuense*; Sgu = *S. guangdongense*; Sy = *S. yirgalemense*; Sch = *S. cholashanense*; Sf = *S. feltiae*; Sb = *S. bicornutum*; Sd = *S. diaprepesi*.



Específicamente, en el estado de Hidalgo aún no se cuenta con reportes de aislamiento e identificación de especies de NEP's propias de la región, que puedan ser de importancia económica como agentes de control biológico, para tratar de reducir así, el uso de productos químicos que contaminan el medio ambiente. Como se mencionó anteriormente, se ha visto que no sólo los plaguicidas pueden dañar nuestro ecosistema: la introducción de especies exóticas que puede causar desequilibrios, atentando contra la flora y fauna del lugar donde son usados. Por ello, es importante proponer otras alternativas que ayuden a mejorar la ecología y economía de nuestra región, como es el uso de bioinsecticidas nativos.

1.5 Justificación

Para evitar pérdidas económicas importantes ocasionadas por plagas en cultivos agrícolas se han usado grandes cantidades de diferentes pesticidas químicos, los cuales en muchas ocasiones se han asociado con problemas ambientales y de salud. Debido a lo anterior, es urgente la búsqueda de métodos de control de plagas más eficientes y menos perjudiciales para el medio ambiente y salud del género humano. Dentro de las opciones que se tienen, el uso de nemátodos entomopatógenos con actividad bioinsecticida se presenta prometedor debido a las propiedades que estos organismos tienen de buscar activamente a sus insectos presa y por la variedad de especies de insectos plaga que pueden ayudar a controlar.

Por otra parte, en un afán de conservar o alterar lo menos posible la biodiversidad existente en los distintos ecosistemas, la práctica del biocontrol de insectos plaga mediante el uso de nemátodos entomopatógenos actualmente tiende a usar preferentemente especies de nemátodos endémicos de las zonas geográficas donde serán aplicados para el biocontrol, en lugar de usar especies exóticas aisladas de nichos ecológicos diferentes, que por otra parte aún continúa siendo la práctica más ampliamente usada en muchos agrosistemas. Más aún, se



ha reportado que el uso de especies nativas de nemátodos entomopatógenos en prácticas de biocontrol de insectos es frecuentemente más eficaz que el correspondiente a especies exóticas, cuando los especímenes han sido aplicados en igualdad de circunstancias.

Por las razones anteriores, varios grupos de investigación se han dado a la tarea de aislar especies de nemátodos entomopatógenos y sus bacterias simbióticas en las regiones donde eventualmente podrán ser usados en estrategias de manejo integrado de plagas, reportándose en varios casos la presencia de nuevas especies o de variedades distintas mejor adaptadas al entorno donde éstas serán usadas. Sin embargo, estudios de este tipo son poco frecuentes en nuestro país e inexistentes en el Estado de Hidalgo, lo cual nos puede dar una idea de lo poco explorado de nuestra biodiversidad que por otra parte es necesario conocer para saber de su potencial aprovechamiento para el desarrollo económico del estado.

Con base en lo anterior, el propósito del presente proyecto de investigación es lograr el aislamiento e identificación de especies de nemátodos entomopatógenos silvestres en el Estado de Hidalgo, con la finalidad de incrementar el conocimiento sobre biocontrol de plagas agrícolas mediante el uso de estos organismos, y así contribuir paulatinamente al acceso hacia una agricultura sustentable en nuestro estado y en el país.

1.6 Hipótesis

En el Estado de Hidalgo existen nemátodos entomopatógenos silvestres que pueden ser aislados e identificados mediante métodos disponibles.



1.7 Objetivos

1.7.1 Objetivo General

Identificar nemátodos entomopatógenos aislados en el Estado de Hidalgo, con potencial para ser usados en control biológico de plagas, a través de métodos morfométricos y moleculares.

1.7.2 Objetivos Específicos

- Aislar nemátodos entomopatógenos con potencial biocontrolador, a partir de muestras de suelos del Estado de Hidalgo, mediante el uso de larvas de insectos susceptibles.
- Identificar taxonómicamente a nemátodos entomopatógenos aislados de suelos del Estado de Hidalgo, mediante técnicas de microscopía y de biología molecular.



Capítulo 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Ubicación de los sitios de recolección y de estudio de las muestras

Para realizar el presente estudio se usaron muestras de suelos provenientes de la Sierra de Tenango, Valle de Tulancingo, Comarca Minera, Altiplanicie Pulquera, Cuenca de México y Valle del Mezquital, y todas ellas fueron trasladadas al Instituto de Ciencias Agropecuarias para su posterior estudio en el laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CICyTA) de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, ubicada en Av. Universidad km 1, Rancho Universitario. Tulancingo, Hidalgo, CP 43600.

La identificación por métodos moleculares y estudios de microscopía electrónica de barrido se efectuaron en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV – IPN) Unidades Irapuato, Guanajuato, y Zacatenco, Ciudad de México, respectivamente.



2.2 Recuperación de nemátodos del suelo

2.2.1 Obtención de las muestras de suelo

Para poder coleccionar una mayor cantidad de muestras de suelo, en esta investigación se formaron tres grupos de recolección. El periodo en que se llevo a cabo el muestreo fue entre los meses de Agosto y Septiembre del 2007. Muestras de tierra de aproximadamente 2 kg, fueron coleccionadas usando palas de mano para jardinería, excavando a una profundidad de 10 a 20 cm, y colocadas en bolsas de polietileno. Cada muestra de tierra se compone de tres submuestras de 667 g aproximadamente, coleccionadas al azar en un área de aproximadamente 10 m² por sitio de muestreo. Una vez en el laboratorio, las muestras de tierra fueron homogenizadas y colocadas en botes de plástico transparentes de 1 L (Figura 7), obteniendo así dos submuestras (A y B) por cada bolsa de 2 kg.



Figura 7. Muestras de suelos del Estado de Hidalgo, almacenadas en botes transparentes de 1 L.

2.2.2 Aislamiento de nemátodos entomopatógenos

En el presente estudio se usó la técnica de aislamiento llamada “Bioensayo” utilizando a la gran palomilla de la cera, *Galleria mellonella*, como cebo para el aislamiento (Woodring y Kaya, 1988). Seis larvas de *Galleria mellonella* del último estadio fueron colocadas en el fondo de cada bote con tierra. Los botes fueron



almacenados en gavetas, a temperatura de laboratorio y en ausencia de luz. Se revisaron los botes cada 3 d, para ver si las larvas colocadas presentaban signos de haber sido infectadas por NEP's. Las larvas muertas probablemente por NEP's se colocaron en trampas de White (1927) (Figura 8), y se monitorearon diariamente hasta que emergieron los primeros JI. A menudo, los hospederos infectados por NEP's pueden ser reconocidos por su apariencia, ya que se vuelven flácidos y cambian su coloración original a naranja, amarillo o café en caso de infección por steinernemátidos, y rojo parduzco o rojo ladrillo con una débil luminiscencia en la oscuridad si la infección fue por heterorhabdítidos (Woodring y Kaya, 1988). Los JI fueron colectados durante 3 d después de emerger por primera vez de las larvas y para su preservación fueron lavados 3 veces con solución salina estéril (0.9% p/v NaCl) y almacenados en botellas de cultivo de tejidos de 50 mL y 250 mL a temperatura ambiente.



Figura 8. Trampa de White (1927). Larvas infectadas probablemente por nemátodos entomopatógenos aislados en muestras de suelo del Estado de Hidalgo.



2.3 Medición de los factores edafológicos

Dentro de cada una de las regiones de muestreo se registraron características cualitativas (localidad de estudio, agrosistemas involucrados (por ejemplo, tipos de cultivos)) y características cuantitativas de los suelos (pH y humedad). Para determinar el pH del suelo se pesaron 10 g de muestra en un vaso de precipitados de 100 mL y se añadieron 20 mL de agua destilada, se agitó la solución en intervalos regulares (aproximadamente cada 10 min) durante media hora. Posteriormente se tomó la lectura de pH a la suspensión de suelo mediante potenciómetro (pH 510 Series, OAKTON). La humedad del suelo se determinó mediante diferencia de peso seco. Se pesó 3 g de muestra en una cápsula de aluminio y se secó en un horno de convección (1380FX, Shel-LAB) a 100 °C durante 24 h.

2.4 Identificación de nemátodos entomopatógenos

2.4.1 Microscopía de Campo Claro (MCC)

La técnica usada para la preparación de los nemátodos se tomó de Kaya y Stock (1997). Los reactivos utilizados son los siguientes;

- Agua destilada
- Solución fijadora TAF (2% v/v trietanolamina, 7% v/v formalina (formaldehído al 38% v/v), 91% v/v agua destilada)
- Solución Ringer (0.9% p/v NaCl, 0.04% p/v KCl, 0.04% p/v CaCl₂, 0.02% p/v NaH₂CO₃)
- Glicerina
- Solución I (1% v/v glicerina, 20% v/v etanol al 95%, 79% v/v agua destilada)
- Solución II (5% v/v glicerina, 95% v/v etanol al 95%)



Procedimiento

1. Los nemátodos fueron sacrificados por calor en un baño de agua a 60 °C durante 2 min. Una vez muertos se adicionó la solución fijadora y solución Ringer en igual proporción, previamente calentadas a 60 °C aproximadamente. Por ultimo las muestras se almacenaron 24 h en refrigeración. Posteriormente se adicionó solución fijadora a 65 °C para dejarla infiltrar en los nemátodos durante 24 h.
2. Se transfirieron los nemátodos a una caja petri con la menor cantidad de solución fijadora posible y se adicionó 2 mL de la Solución I (Figura 9A). La caja petri se colocó en un desecador lleno con etanol al 95% v/v (Figura 9B) y el desecador se dejó 24 h en una estufa a 35 °C (Figura 9C). Transcurrido este tiempo, las cajas petri se llenaron con la Solución II (Figura 9E) y se colocaron de nuevo en el desecador parcialmente destapado (Figura 9F), y este se colocó en la estufa a 40 °C por 3 h.

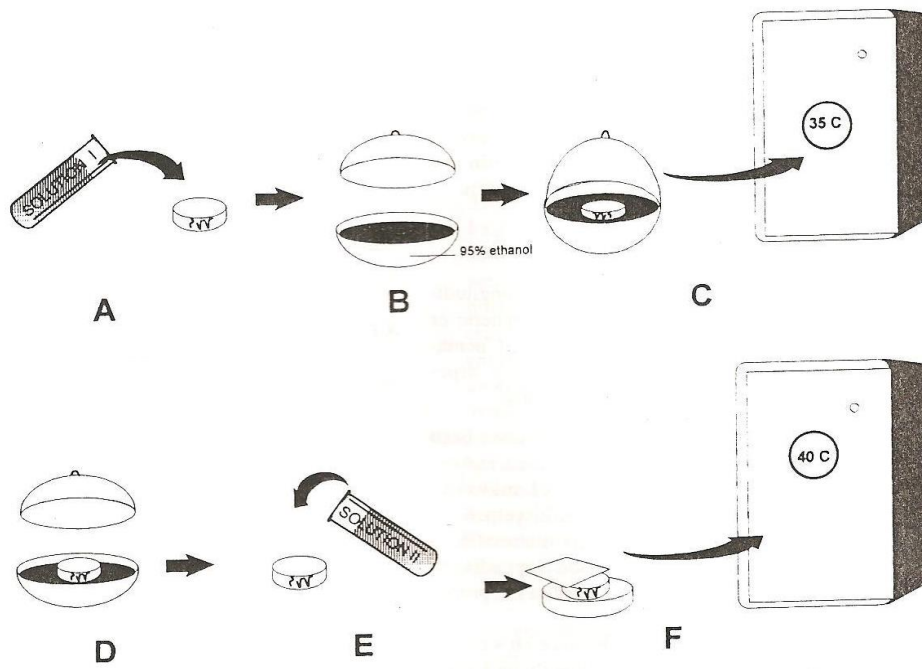


Figura 9. Diagrama del procesamiento de nemátodos en glicerina, para su observación en el microscopio de campo claro (Tomado de Kaya y Stock, 1997).



Una vez terminado el proceso los nemátodos se observaron en un microscopio de luz NIKON ECLIPSE 80i y se fotografiaron con una cámara digital NIKON DS-Fi1. Las fotografías fueron analizadas mediante el software Nis-Elements F.

2.4.2 Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)

La técnica usada en este estudio para la preparación de las muestras fue tomada de Kaya y Stock (1997). Los reactivos que se utilizaron son los siguientes;

- Agua destilada
- Buffer de fosfatos (PBS) ajustado a pH 7.4 (0.8% p/v NaCl, 0.02% p/v KCl, 0.114% p/v Na₂HPO₄)
- Glutaraldehído al 8% v/v (glutaraldehído al 25% grado ME diluido en PBS)
- Tetróxido de osmio al 1% v/v
- Etanol a distintas concentraciones (50, 60, 70, 80, 90 y 100% v/v)
- CO₂ líquido

Procedimiento

1. Se colocaron los nemátodos en un baño de agua a 60 °C por 2 min para sacrificarlos.
2. Los nemátodos se lavaron 3 veces con PBS (2 min entre cada cambio).
3. La prefijación se realizó con glutaraldehído al 8% v/v, se dejaron los nemátodos toda la noche en agitación moderada en una plataforma agitada (movimiento sube y baja) ELMECO RP-50.
4. El sobrenadante fue retirado y los nemátodos lavados 3 veces con PBS filtrado (5 min entre cada cambio).
5. Para realizar la post-fijación se adicionó tetróxido de osmio al 1% v/v y se dejó las muestras en agitación moderada por 2 h.



6. Se retiró el tetróxido de osmio y se lavaron 6 veces las muestras con PBS (5 min entre cada cambio con agitación moderada).
7. Las muestras se deshidrataron usando una serie de lavados con etanol (50, 60, 70, 80, 90 y 100%) (10 min entre cada cambio con agitación moderada).
8. Se secaron los nemátodos al punto crítico con CO₂ líquido en un secador al punto crítico SAMDRI-780.
9. Se sombrearon los nemátodos con oro durante 1 min en una Evaporadora Desk II, Denton Vacuum.
10. Los nemátodos se observaron y retrataron en un MEB – JEOL 35C.

2.4.3 Caracterización morfométrica

En esta parte del trabajo nos enfocamos principalmente al estudio de las fases infectivas (JI) de los nemátodos aislados de la familia *Steinernema* spp., tomando en cuenta 6 caracteres de su estructura general y las proporciones “D” (PE / LE) y “E” (PE / LC) (Figura 6).

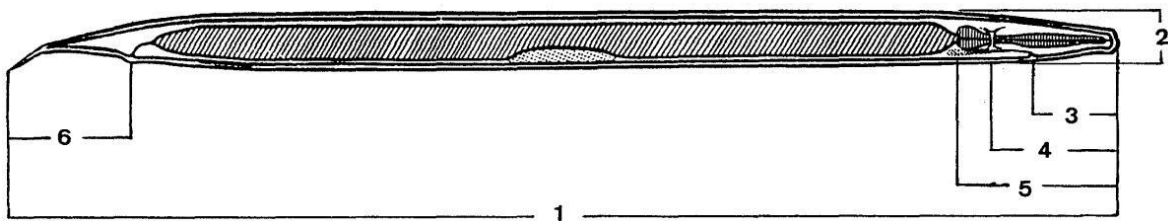


Figura 6. Estructura general de las fases JI de nemátodos de la familia *Steinernema* spp.: 1. Longitud total (LT) 2. Anchura máxima (AM) 3. Distancia del extremo de la cabeza al poro excretor (PE) 4. Distancia del extremo de la cabeza al anillo nervioso (AN) 5. Longitud del esófago (LE) 6. Longitud de la cola (LC) (García-del Pino, 1994)

2.4.4 Caracterización molecular

Esta técnica se realizó de acuerdo al método establecido por el grupo de trabajo del Dr. Jorge E. Ibarra R. en el Departamento de Biotecnología y Bioquímica del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV – IPN) Unidad Irapuato, Guanajuato.



Materiales y reactivos

- Agua desionizada estéril (libre de nucleótidos)
- Solución M9 (0.6% p/v Na₂HPO₄, 0.3% p/v KH₂PO₄, 0.5% p/v NaCl, 0.025% p/v MgSO₄·7H₂O)
- Buffer Lisis (0.2 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl pH 8.5, 50 mM EDTA, 0.5% v/v SDS)
- Proteinasa K marca Invitrogen
- RNAsa A marca Invitrogen
- Fenol liquido marca Invitrogen
- Fenol/Cloroformo/Alcohol Isoamílico (25 µL: 24 µL: 1 µL)
- Cloroformo saturado
- Etanol al 96%
- Etanol al 70%
- Solución 5 M de NaCl
- Mezcla de reacción (ADN, Primers, dNTP's, MgCl₂, Taq DNA pol Platinum, Buffer 10X, H₂O)
- Primers (Vrain *et al.*, 1992);
18S forward 5'- TTGATTACGTCCCTGCCCTTT -3'
26S reverse 5'- TTTCACTCGCCGTTACTAAGG -3'

Procedimiento

1. Extracción de ADN
 - 1.1 Limpieza de la suspensión

Las suspensiones de nemátodos se colocaron en unos tubos de vidrio y se dejaron sedimentar. Posteriormente se retiró el sobrenadante, y se repitió el procedimiento por lo menos tres veces con agua desionizada para limpiar la suspensión de nemátodos. Al final, se dejó sedimentar la suspensión para retirar el sobrenadante y obtener así una pastilla.



1.2 Extracción

a) Una vez limpios los nemátodos, una parte de la pastilla de éstos se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL adicionándose 500 μ L de la solución M9 para resuspender los nemátodos; se agitó y dejó sedimentar. Se retiró el sobrenadante y este procedimiento se repitió una vez más. Con cuidado, se retiró la mayor cantidad de sobrenadante posible y se dejó únicamente la pastilla de nemátodos (para la extracción del ADN es suficiente una pastilla de aproximadamente 100 μ L).

b) Se adicionó 400 μ L de Buffer Lysis y 10 μ L de proteinasa K, mezclando cuidadosamente. La mezcla se incubó a 65 °C por 30 min en un thermoblock marca Digi-Block JR, Laboratoy Devices Inc., USA (durante la incubación se mezcló cada 2 min).

c) Se adicionaron 10 μ L más de proteinasa K y se incubó 35 min más a 65 °C sin agitación alguna.

d) Se adicionó 5 μ L de RNAsa A y se incubó por 30 min a 37 °C.

e) Se adicionó 500 μ L de fenol y se mezcló gentilmente en un agitador orbital (ECOLAN 300) a 45 rpm, durante 30 min.

f) Se centrifugó por 5 min a 14,000 rpm en una centrifuga Eppendorf 5415C Micro Centrifuge. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf y se adicionaron 500 μ L de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico. Se mezcló gentilmente en un agitador orbital (ECOLAN 300) a 45 rpm a durante 30 min.

g) Se centrifugó por 5 min a 14,000 rpm. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo y se adicionó 500 μ L de cloroformo, mezclando gentilmente durante 30 min.



h) Se centrifugó por 5 min y se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo. Se adicionó 1 mL de etanol al 96% (a temperatura ambiente) y se mezcló, para dejar precipitar el ADN durante toda la noche a temperatura ambiente.

i) Al día siguiente se separó el ADN (centrifugando durante 10 min a 14,000 rpm), se retiró el sobrenadante y la pastilla de ADN se lavó con 1 mL de etanol al 70%, se centrifugó nuevamente el ADN (5 min, 14,000 rpm) y se retiró el sobrenadante. La pastilla se dejó secar, colocando el tubo en posición invertida y destapado, para posteriormente resuspenderla en 200 μ L de agua desionizada estéril.

j) Se cargaron 2 μ L de la suspensión anterior junto con 5 μ L de buffer de carga en gel de agarosa al 1%, para estimar la concentración y la integridad del ADN (Anexo 1 y 2)

2. Amplificación del fragmento de ADN por PCR

2.1 Precipitación del ADN

a) Al ADN que se había resuspendido en 200 μ L de agua, se le agregó 2 volúmenes de etanol al 96% por volumen de suspensión y 20 μ L de solución 5 M de NaCl. Se dejaron las muestras por 20 min a -70 °C para que precipitara el ADN.

b) Después se centrifugó la muestra durante 15 min a 14,000 rpm. Se retiró el sobrenadante y se agregaron 500 μ L de etanol al 70%, la pastilla se resuspendió y se volvió a centrifugar por 15 min a 14,000 rpm.

c) Se retiró el sobrenadante con mucho cuidado. En el fondo del tubo quedó una pequeña pastilla de ADN.

d) Se colocó el tubo en posición invertida y destapado, para que se secase.



- e) Una vez seca, se resuspendió la pastilla de ADN en 200 μ L de agua, asegurándose que el ADN quedase bien resuspendido.

2.2 Preparación de la mezcla de reacción

Para cada muestra de ADN, en un tubo Eppendorf de 250 μ L se mezcló lo siguiente:

1.00 μ L de suspensión de ADN

1.00 μ L de iniciador 18sf 5'- TTGATTACGTCCCTGCCCTTT -3'

1.00 μ L de iniciador 26sr 5'- TTTCACTCGCCGTTACTAAGG -3'

1.00 μ L de dNTP's

1.00 μ L MgCl₂

0.20 μ L Taq DNA pol Platinum

2.50 μ L Buffer 10X

17.3 μ L H₂O

Se colocó el tubo con la mezcla de reacción en un termociclador Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400 y se programó con las siguientes condiciones de amplificación: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, 35 ciclos de 95 °C por 50 s, 55 °C por 50 s y 72 °C por 1 min 30 s, la extensión final a 72 °C por 7 min. El tamaño del producto esperado puede ser de 1,000 a 1,100 pb. Para saber el tamaño del producto, se compara la banda del producto amplificado con las bandas del marcador usado (Figura 24)(Anexo 1.2).

3. Cuantificación de los productos de PCR

3.1 Precipitación de productos de PCR

- a) Después de terminada la reacción de PCR, se transfirieron los productos obtenidos a un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se adicionaron 200 μ L de H₂O,



400 μL de etanol al 96% y 20 μL de solución 5 M de NaCl. Se enfrió el tubo a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 min, para precipitar el ADN.

b) La muestra se centrifugó durante 15 min a 14,000 rpm, y se retiró el sobrenadante. Se agregaron 500 μL de etanol al 70%, resuspendiéndose ligeramente para centrifugarse por 15 min a 14,000 rpm.

c) Se retiró el sobrenadante con mucho cuidado evitando arrastrar el ADN amplificado. Se colocó el tubo en posición invertida y destapado, para secara.

d) Se resuspendió totalmente el ADN en 15 μL de agua.

e) En otro tubo se adicionó 1 μL de la resuspensión de productos de amplificación en 999 μL agua, se homogenizó y se colocó todo el volumen en una celda para leer en el espectrofotómetro a 260 nm (Anexo 2.2)

4. Secuenciación

Los productos obtenidos de la PCR listos para su secuenciación, se enviaron al Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad en el CINVESTAV-IPN unidad Irapuato, el cual cuenta con equipamiento de última generación para llevar a cabo la secuenciación de genomas por los métodos de Sanger. Los resultados obtenidos de la secuenciación fueron comparados en el GEN BANK del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en ingles) con secuencias de *Steinernema* usando BLAST, pagina web www.ncbi.nlm.nih.gov.



Capítulo 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Determinación y distribución de los nemátodos entomopatógenos

Se colectaron un total de 165 muestras de suelo. Con el propósito de aislar nemátodos entomopatógenos, se colocaron larvas del último estadio de desarrollo de la polilla mayor de la cera, *Galleria mellonella*, como insecto cebo (Figura 10). Al momento de redactar el presente documento, en el aislamiento, 38 muestras de suelo colectadas dieron positiva la presencia de nemátodos entomopatógenos, lo cual representa un porcentaje de abundancia de NEP's del 23% del total de sitios muestreados. Estos resultados son los primeros en su tipo reportados en el estado de Hidalgo. En el país, son pocos los grupos que se han ocupado de estos asuntos, entre los que se pueden mencionar los trabajos de: a) Salas-Luévano (2002) quien reportó un porcentaje de abundancia de NEP's del 50% con base a 72 sitios de muestreo en la región centro sur de Zacatecas; b) Lozano-Gutiérrez (2001) reportó una abundancia de NEP's de 8% en la zona oeste de Zacatecas; y c) Molina-Ochoa *et al.* (2003) reportaron una abundancia del 11% considerando 64 sitios en los estados de Colima, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Sinaloa y Veracruz. Por otra parte, grupos de otros países han reportado abundancias de NEP's del 14% (100 sitios en la región de la Rioja, España; Campos-Herrera *et al.*, 2007),



23% (150 sitios en la región de Cataluña, España; García-del Pino, 1994), 23.3% (120 sitios en el sur de Arizona, EUA; Stock y Gress 2006), y 2% (1,080 sitios en Turquía; Hazir *et al.*, 2003), entre otros.



Figura 10. Larvas de *Galleria mellonella* en muestras de suelo del Estado de Hidalgo, señaladas con flechas, durante aislamiento de nemátodos entomopatógenos.

De las 38 muestras de suelo que habían dado positiva la presencia de NEP's, el 42.1% correspondieron a steinernemátidos y 57.9% a heterorhabdítidos, de acuerdo con los criterios sugeridos por Woodring y Kaya (1988) (tomando como base la coloración que presentan las larvas de *Galleria mellonella* muertas por infestación de NEP's). La Figura 11 presenta aspectos frecuentes exhibidos por larvas de *Galleria mellonella* usadas como cebos y probablemente muertas por la acción de distintos NEP's presentes en suelos del Estado de Hidalgo. Las larvas "blanquecino-cremosas" sugieren la acción biológica del complejo *Steinernema* spp./*Xenorhabdus* spp. mientras que las "rojizas", de *Heterorhabditis* spp./*Photorhabdus* spp. (Shapiro-Ilan y Gaugler, 2002).



Figura 11. Larvas de *Galleria mellonella* infectadas probablemente con NEP's presentes en suelos del Estado de Hidalgo. A) larvas muertas por el complejo *Steinernema* spp./*Xenorhabdus* spp. B) larvas muertas por el complejo *Heterorhabditis* spp./*Photorhabdus* spp.

De los trabajos realizados por otros autores aislando NEP's en México, acerca de la frecuencia de steinernemátidos y heterorhabdítidos, se puede destacar lo siguiente: a) de los 40 aislados reportados por Salas-Luévano (2002), 45% fueron steinernemátidos y 55% fueron heterorhabdítidos; b) de los 7 NEP's aislados por Lozano-Gutiérrez (2001) 71.4% fueron heterorhabdítidos y 28.5% fueron steinernemátidos; c) mientras que Molina-Ochoa *et al.* (2003) reportaron una proporción de NEP's aislados de 71.4% steinernemátidos y 28.5% heterorhabdítidos. Por otra parte, en España, de 27 NEP's aislados, Campos-Herrera reportaron 20 steinernemátidos (74%) y 7 aislados de especie desconocida; en ese mismo país, del total de NEP's que aisló, García-del Pino (1994) reportó 94.3% steinernemátidos y 5.7% heterorhabdítidos. En un estudio realizado en el sur de Arizona, EUA, Stock y Gress (2006) reportaron 78.5% steinernemátidos y 21.5% heterorhabdítidos; finalmente, Hazir *et al.* (2003) reportaron 68.2% steinernemátidos y 31.8% heterorhabdítidos de los NEP's aislados en Turquía.

De acuerdo con los resultados presentados, la distribución de ambos géneros de NEP's son muy variables: se pueden encontrar lugares donde dominan los steinernemátidos, como en algunas regiones de España, pero



también existen otros donde predominan los heterorhabdítidos. Ejemplos de esto último es justamente lo que se ha encontrado en los sitios muestreados en el presente trabajo referente al Estado de Hidalgo. Lo anterior seguramente se debe a distintas causas que han afectado la evolución y distribución de las especies de NEP's, entre las que pueden citarse la distribución de insectos hospederos, los factores edafológicos y factores climatológicos, entre otros. El Cuadro 6 presenta los NEP's aislados hasta el momento así como los lugares donde éstos fueron encontrados, mostrados gráficamente en el mapa de la Figura 12.

Cuadro 6. Nemátodos entomopatógenos aislados en distintas locaciones del Estado de Hidalgo

Clave	Localidad	Descripción	GN*
NH-1S	Alcholya	Barranca de Metztlán	S
NH-2H	Tezontepec – Rancho “Chiripa”	Orilla de río Tula	H
NH-3S	Tula – San Francisco	Frente a refinería, cultivo maíz y alfalfa	S
NH-4H	Tepeji del Rio	Cultivo alfalfa, río Tula	H
NH-5H	Melchor Ocampo – Col. El salto	Cultivo maíz	H
NH-6S	Tepeji del Rio	Cultivo avena, junto a río	S
NH-7H	Tezontepec – Rancho “Chiripa”	Junto a rio	H
NH-8H	Ixmiquilpan – Progreso, “El Alberto”	Cultivo maíz y alfalfa	H
NH-9H	Presa los Ángeles	Cultivo maíz, haba, maguey	H
NH-10H	Presa los Ángeles	Cultivo maíz	H
NH-11H	Villas de Tezontepec	Corral de Borregos	H
NH-12S	Camino Unión Ejidal, Tierra y Libertad	Cultivo cebada	S
NH-13H	Villas de Tezontepec –Desviación cerro de Tlexpa	Cultivo cebada	H
NH-14H	Xejeta – camino a Alfajayucan	Cultivo maíz	H
NH-15S	La estancia – camino a Progreso	Cultivo calabaza	S
NH-16H	Tepetitlán	Árbol Guanábana	H
NH-17S	Alfajayucan	Cultivo maíz	S
NH-18H	San Mateo – Ixcuinquitlapilco	Cultivo maguey, árbol pirul	H



NH-19S	Camino a Progreso	Cultivo maíz	S
NH-20H	Atitalaquia – cerca río Tula	Cultivo maíz, carrizo	H
NH-21S	Desviación a Tepepa	Árbol tejocote	S
NH-22S	La Paila	Cerca de pozo	S
NH-23S	Camino entre Lagunicatlán y Loma Chica	Bosque encino y pino	S
NH-24S	Sto. Domingo – rumbo a Agua Zarca	Bosque de Encino	S
NH-25H	Vicente Guerrero – Ajacuba	Cultivo cebada, nopal, árbol pirul	H
NH-26H	Alfajayucan	Vegetación diversa, araucaria	H
NH-27H	Ajacuba	Cultivo maíz, alfalfa, pasto	H
NH-28S	Axaxochitlan – Zacacuautla	Cultivo maíz	S
NH-29S	Entronque Tepeapulco	Cultivo maguey	S
NH-30H	Villas de Tezontepec – Faldas de cerro, mina Chamberluco	Cultivo maguey	H
NH-31H	Tezontepec de Aldama – Sta. Ma. Batha	-	H
NH-32H	Ixmiquilpan – Progreso, “El Alberto”	Cultivo chile, reserva Ecoalberto	H
NH-33H	Ixmiquilpan – Progreso, “El Alberto”	Cultivo calabaza	H
NH-34H	Melchor Ocampo, Col. El Salto	Cultivo maíz	H
NH-35H	NR*	NR	H
NH-36S	Matías Rodríguez – entronque autopista	Tierras sin cultivar, vegetación diversa	S
NH-37S	Camino a Loma Chica	Bosque Encino y Pinos	S
NH-38S	Loma Chica – llegando a San Dionisio	Cancha de futbol	S

*GN = Género, NR = No reportado, S = *Steinernema* spp., H = *Heterorhabditis* spp.

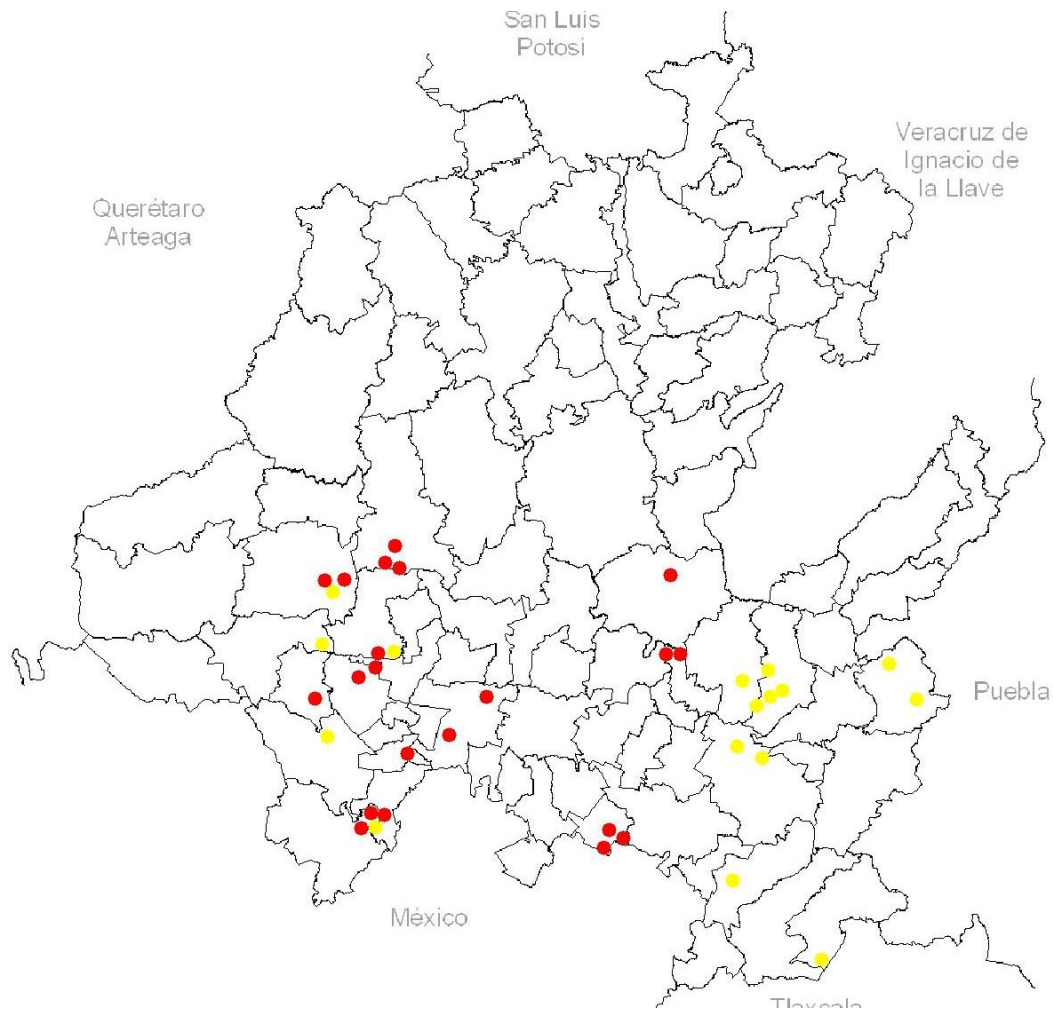


Figura 12. Mapa del Estado de Hidalgo que muestra los sitios de muestreo donde dieron positivos los aislamientos de nemátodos entomopatógenos: ● aislamiento de steinernemátidos, ● aislamiento de heterorhabdítidos.

3.2 Factores edafológicos

Los factores que se tomaron en cuenta en este aspecto fueron el pH y la humedad de los lugares donde se obtuvieron las muestras de suelo.

3.2.1 pH del suelo

Los rangos de pH de los suelos donde se aislaron nemátodos entomopatógenos fueron $3.68 < \text{pH} < 7.95$ para steinernemátidos y $4.91 < \text{pH} < 8.49$ para heterorhabdítidos (Figura 13).

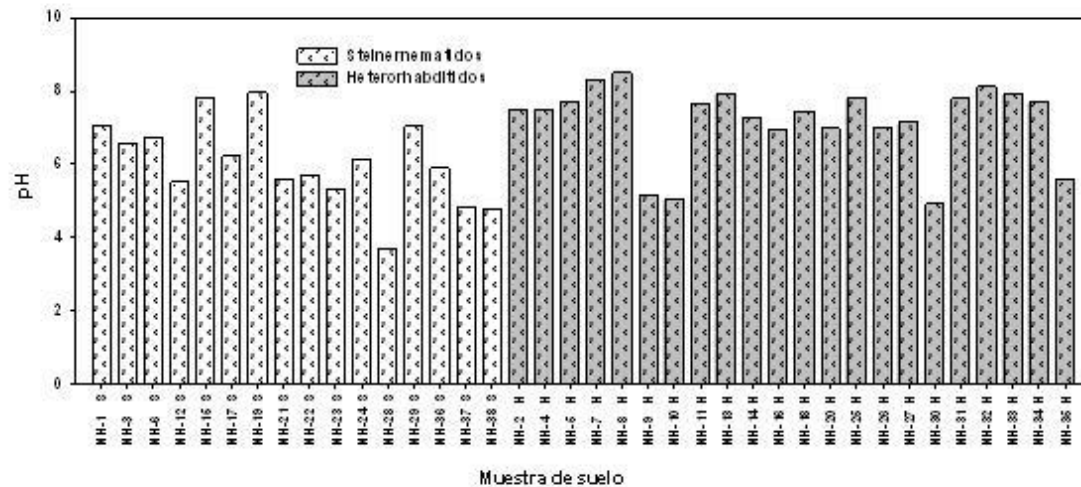


Figura 13. pH de las muestras de suelo donde se aislaron steinernemátidos y heterorhabdítidos en el Estado de Hidalgo.

De acuerdo con los resultados, los NEP's aislados en el presente trabajo habitan desde suelos ácidos hasta alcalinos. Aparentemente los steinernemátidos pueden ser encontrados en pH's más ácidos. En trabajos sobre esta línea de investigación, otros autores han encontrado resultados similares: a) Hazir *et al.* (2003) aislaron steinernemátidos en $5.6 < \text{pH} < 7.9$ y heterorhabdítidos en $6.3 < \text{pH} < 7.7$; b) Rosa *et al.* (2000) aislaron steinernemátidos en $5.2 < \text{pH} < 6.0$ y heterorhabdítidos en $5.6 < \text{pH} < 6.3$; y c) Campos-Herrera *et al.* (2007) reportan el aislamiento de steinernemátidos en pH's de 4.9 a 8.3. Sin embargo, otros autores han reportado valores de pH menos ácidos o sólo alcalinos tanto para steinernemátidos como para heterorhabdítidos: Stock y Gress (2006) aislaron ambos géneros de NEP's en pH's de 7.4 a 7.5; Salas-Luévano (2002) aisló steinernemátidos en $6 < \text{pH} < 8.4$ y heterorhabdítidos en $6 < \text{pH} < 9.2$, y Lozano-Gutiérrez (2001) reporta el aislamiento de steinernemátidos y heterorhabdítidos a pH's de 8.2 a 8.3 y 7.7 a 8.1, respectivamente. Como puede observarse, aparentemente no existe un patrón que indique una dependencia clara entre género de NEP's con pH del suelo, lo cual puede implicar la interdependencia con otros factores.



Por otra parte ciertos autores se han dado a la tarea de evaluar los efectos del pH del suelo sobre la supervivencia y patogenicidad de los NEP's. Por ejemplo, Kung *et al.* (1990) reportan que la supervivencia y patogenicidad sólo disminuye ligeramente conforme se reduce el pH de 8 a 4, no sucediendo así cuando existe un pH de 10 ya que entonces la supervivencia y la patogenicidad disminuyen drásticamente. Fisher y Führer (1990), mencionan que el decremento en el pH del suelo reduce la habilidad de *Steinernema kraussei* para encontrar a su hospedero, mientras que Steiner (1996) reportó una selección en la preferencia de pH por parte de algunos de NEP's, los cuales se encontraron relativamente bajos para *Steinernema kraussei*, evitando pH extremos para *Steinernema intermedium* (Poinar) y *Steinernema feltiae*, y cerca del neutral para *Steinernema affine*.

3.2.2 Humedad del suelo

Los porcentajes de humedad en base peso seco, obtenidos para las muestras de suelo de steinernemátidos variaron de 5.7% a 59.7% y para heterorhabdítidos de 11.9% a 48.6% (Figura 14). Diversos autores reconocen que la humedad del suelo es importante para la subsistencia y adecuada actividad biológica de los NEP's (Salas-Luévano, 2002; Grewal, 2002), los resultados obtenidos, en el caso de los steinernemátidos aislados en el Estado de Hidalgo, sugieren que es posible encontrar NEP's en suelos tanto húmedos como relativamente secos. En el presente trabajo, los porcentajes de abundancia de NEP's cambiaron notablemente respecto a los distintos porcentajes de humedad de las muestras de suelo colectadas; es decir, que en muestras de suelo con porcentajes de humedad $\leq 10\%$ y $> 21\%$ se encontró mayor % de abundancia de NEP's que en suelos entre el 11% y 20% de humedad (Cuadro 7). Los resultados anteriores concuerdan con lo reportado por Campos-Herrera *et al.* (2007), en La Rioja, España, quienes también encontraron mayor % de abundancia de NEP's en suelos con porcentajes de humedad menores al 10 %, que en suelos con un



contenido de humedad entre el 11% y 20%, para aislados de NEP's del mismo género (Cuadro 7).

Por otro lado, de los heterorhabdítidos aislados en el Estado de Hidalgo, no se encontró la presencia de este género en suelos con % de humedad $\leq 10\%$, mientras que en suelos entre 11-20% y $\geq 21\%$ de humedad, la abundancia de NEP's fue del 76% y 57%, respectivamente (Cuadro 7). Estos resultados muestran cierta similitud con lo reportado por Giayetto *et al.* (2006), en el Alto Valle de Río Negro, Argentina, quienes aislaron heterorhabdítidos en suelos con porcentajes de humedad similares a los encontrados en el presente trabajo (Cuadro 7), lo que pudiese sugerir algún tipo de relación entre el género *Heterorhabditis* y suelos con % de humedad $>11\%$.

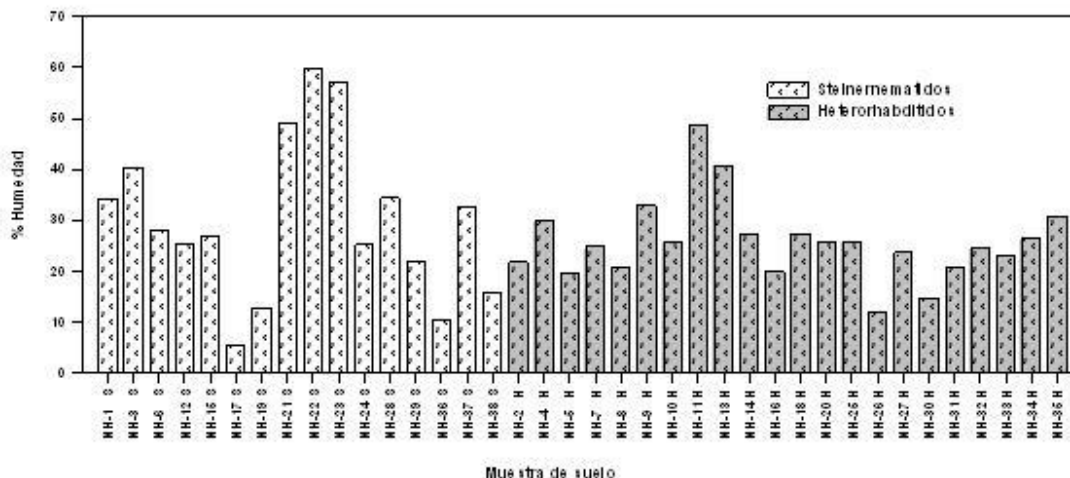


Figura 14. % Humedad en base seca de muestras de suelos del estado de Hidalgo donde se aislaron steinernemátidos y heterorhabdítidos.

**Cuadro 7.** Abundancia de NEP's y humedad de suelos donde fueron aislados

Localidad	Género	% Humedad			Referencia
		≤10%	11 – 20%	≥21%	
Hidalgo, México	<i>Steinernema</i>				
	Abundancia (%)	100	24	43	
	Género aislado		<i>Steinernema</i> spp.		Presente estudio
	<i>Heterorhabditis</i>				
	Abundancia (%)	0	76	57	
	Género aislado	--	<i>Heterorhabditis</i> spp.		
La Rioja, España	<i>Steinernema</i>				Campos-Herrera
	Abundancia (%)	53.4	46.6	0	<i>et al.</i> , 2007
	Especie aislada	* <i>S. f.</i>	<i>S. f.</i> , <i>S. k.</i> , <i>S. c.</i>	--	
Alto Valle de Río Negro, Argentina	<i>Heterorhabditis</i>				Giayetto
	Abundancia (%)	0	21.1	50.0	<i>et al.</i> , 2006
	Especie aislada	--	** <i>H. b.</i>	<i>H. b.</i>	

S. f.*; *S. feltiae*, *S. k.*; *S. krausseii*, *S. c.*; *S. carpocapsae*. *H. b.*; *H. bacteriophora*

3.3 Identificación de nemátodos entomopatógenos

Para lograr la identificación de nemátodos entomopatógenos, los distintos grupos de investigación han considerado entre otros aspectos importantes aquéllos relacionados con la morfología y dimensiones de los distintos estadios de desarrollo de estos organismos, particularmente de adultos y JI (Poinar, 1990; Hominick, 1997; Kaya y Stock, 1997; Stock *et al.*, 1998; Pamjav *et al.*, 1999; Rodríguez, 2001; Nguyen y Duncan, 2002; Ivanova y Spiridonov, 2003; Nguyen *et al.*, 2004; Qiu *et al.*, 2004; Nguyen *et al.*, 2006; Phan *et al.*, 2006; Nguyen *et al.*, 2008). En lo que resta de la presentación de este trabajo, la atención fue centrada en un solo NEP's aislado (clave NH-1S), colectado de muestras de suelo de la barranca de Metztlán, Alcholoaya, Hidalgo.



3.3.1 Evaluación morfológica

Para realizar la evaluación morfométrica del espécimen NH-1S aislado, se tomaron en cuenta las características y dimensiones de especímenes visualizadas mediante microscopía de campo claro y de barrido de electrones. En la evaluación morfológica también se tomó en cuenta el diagnóstico de la familia Steinernematidae Chitwood y Chitwood, 1937 (Stock y Hunt, 2005), el cual dice que los adultos generalmente tienen la cabeza corta y ligeramente redondeada, seis labios fusionados con una papila labial en su extremo cada uno, cuatro papilas cefálicas, cutícula lisa, estoma parcialmente colapsado y el poro excretor ventral siendo claramente distinguible. Las hembras: un par de ovarios opuestos, vulva situada en la mitad del cuerpo con o sin labios protuberantes, epiptygma presente o ausente. Los machos: testículo simple y retroflexo, espículas simétricas en pares y separadas, gubernáculo presente, bursa es ausente, 10 a 14 pares de papilas de las cuales de 7 a 10 son precloacales, cola redondeada con o sin mucron (prolongación cuticular del extremo de la cola). Juveniles infectivos: estoma colapsado; sin cutícula con 6 a 8 líneas longitudinales (bandas del campo lateral); esófago e intestinos colapsados; bolsa bacteriana especializada de forma variable localizada al comienzo de los intestinos; poro excretor distinguible en posición anterior al anillo nervioso; cola conoide o filiforme con porción hialina variable; con o sin fasmidios. Parte de las estructuras descritas anteriormente se muestran en el Figura 15.

3.3.1.1 Microscopía de Campo Claro (MCC)

Adultos de primera generación y JI del NEP NH-1S fueron usados para la caracterización morfológica mediante microscopía de campo claro. En la Figura 16 se muestran los aspectos característicos de adultos de primera generación, hembras (A) y machos (B), y estadios JI (C) de nemátodos NH-1S observados mediante preparaciones en fresco bajo el microscopio de campo claro (NIKON ECLIPSE 80i).

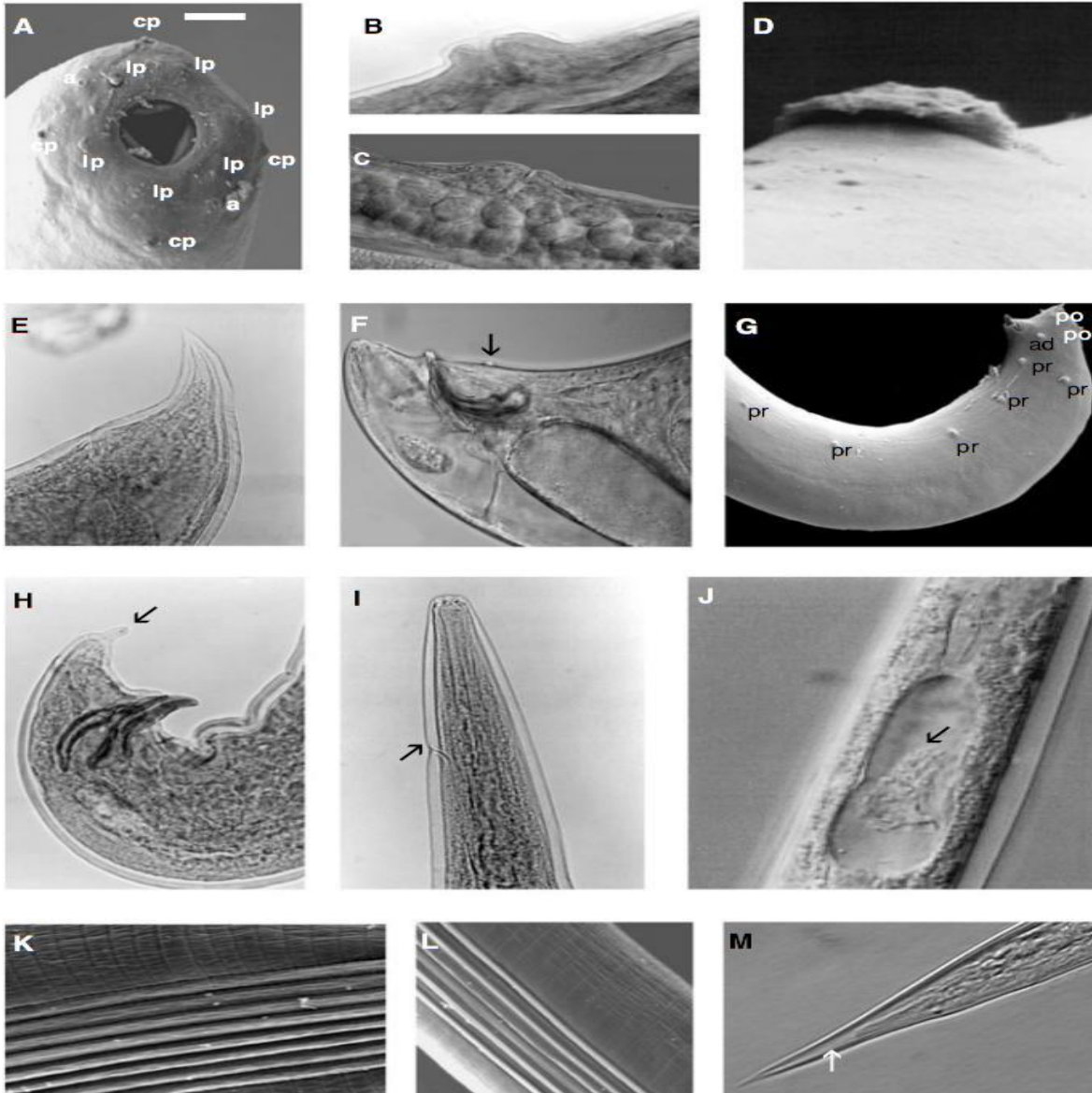


Figura 15. Familia Steinernematidae. A-D. Hembras de primera generación: A) microscopía electrónica de barrido (MEB) mostrando estoma abierto, papilas labiales y cefálicas; B) labios sobresalientes de la vulva (vista lateral); C) labios poco sobresalientes de la vulva (vista lateral); D) epiptygma. E) cola (vista lateral). F-H- Machos de primera generación: F) cola (vista lateral) mostrando singular papila ventral (flecha); G) MEB de la cola mostrando papilas precloacal, adcloacal y postcloacal (vista lateral); H) cola (vista lateral) mostrando el mucron (flecha). I-M. Juveniles infectivos (JI): I) parte anterior mostrando el poro excretor (flecha); J) bolsa bacteriana (vista lateral) mostrando grupos de células bacterianas (flecha); K) y L) MEB de las bandas del campo lateral con (K) ocho y (L) seis líneas; M) cola (vista lateral) mostrando la porción hialina (flecha). (Escala de barras: A, L = 5.5 μm ; B, C, E, F = 25 μm ; D = 35 μm ; G = 40 μm ; H = 23.5 μm ; I, J = 16 μm ; K = 4 μm ; M = 10 μm) (Tomado de Stock y Hunt, 2005).

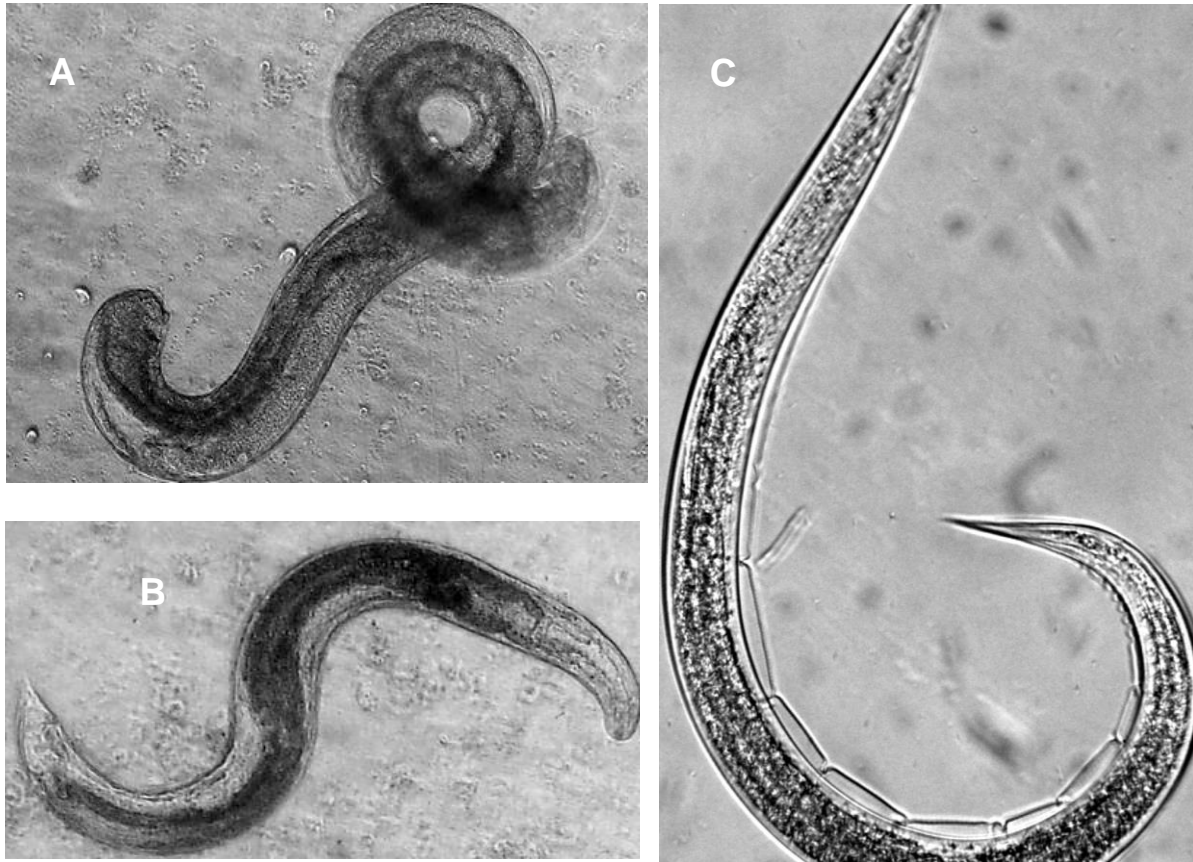


Figura 16. Aspecto de distintos estadios de desarrollo de steinernemátidos NH-1S aislados en el Estado de Hidalgo, bajo el microscopio de campo claro. A) hembra adulta de primera generación; B) macho adulto de primera generación, y C) infectivo juvenil (En todos los casos, 400 aumentos).

En el estudio de microscopía de campo claro se encontró lo siguiente: los adultos presentan una cabeza corta y redondeada (Figura 17A); las hembras poseen vulva con labios protuberantes, situada en la mitad del cuerpo; el epiptygma está ausente (Figura 17C). Los machos tienen un par de espículas simétricas y separadas, presentan gubernaculo (Figura 17B) y la bursa es ausente. Los JI presentan el estoma, esófago e intestinos colapsados, poro excretor distinguible en posición anterior al anillo nervioso (Figura 17F), y cola filiforme con porción hialina visible (Figura 17D). Las descripciones mencionadas anteriormente son características de individuos del género *Steinernema* y han sido frecuentemente reportados por distintos grupos en la literatura (Nguyen *et al.*, 2008; Stock y Hunt, 2005), como puede apreciarse en las Figuras 15 y 18.

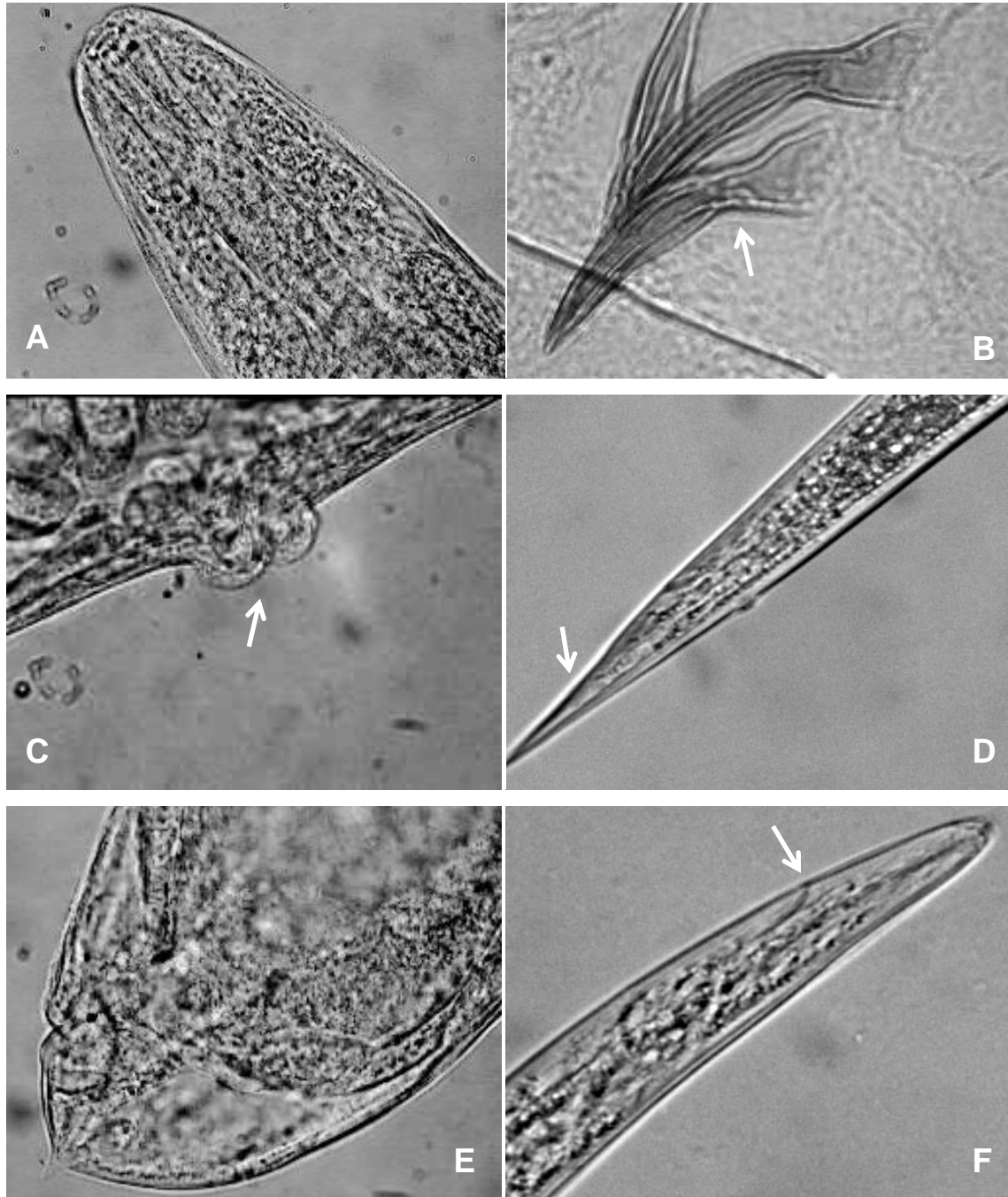


Figura 17. Aspecto de distintas estructuras de algunos estadios de desarrollo de steinernemátidos NH-1S aislados en el Estado de Hidalgo, bajo el microscopio de campo claro. Hembra adulta de primera generación, A) región anterior, C) vulva (vista lateral), y E) región posterior (vista lateral) (400 aumentos). Macho adulto de primera generación, B) espícula (vista lateral) (1,000 aumentos). Fase IJ, D) región posterior o cola (vista lateral) mostrando la porción hialina (flecha), y F) región anterior (vista lateral) mostrando el poro excretor (flecha) (400 aumentos).



Los resultados anteriores son de las estructuras que se pudieron observar mediante microscopía de campo claro, en el siguiente punto se identificarán otras estructuras mediante MEB. Hasta el momento las características descritas de los adultos y JI del NEP NH-1S coinciden con el diagnóstico de la Familia Steinernematidae Chitwood y Chitwood, 1937, reportado por Stock y Hunt (2005).

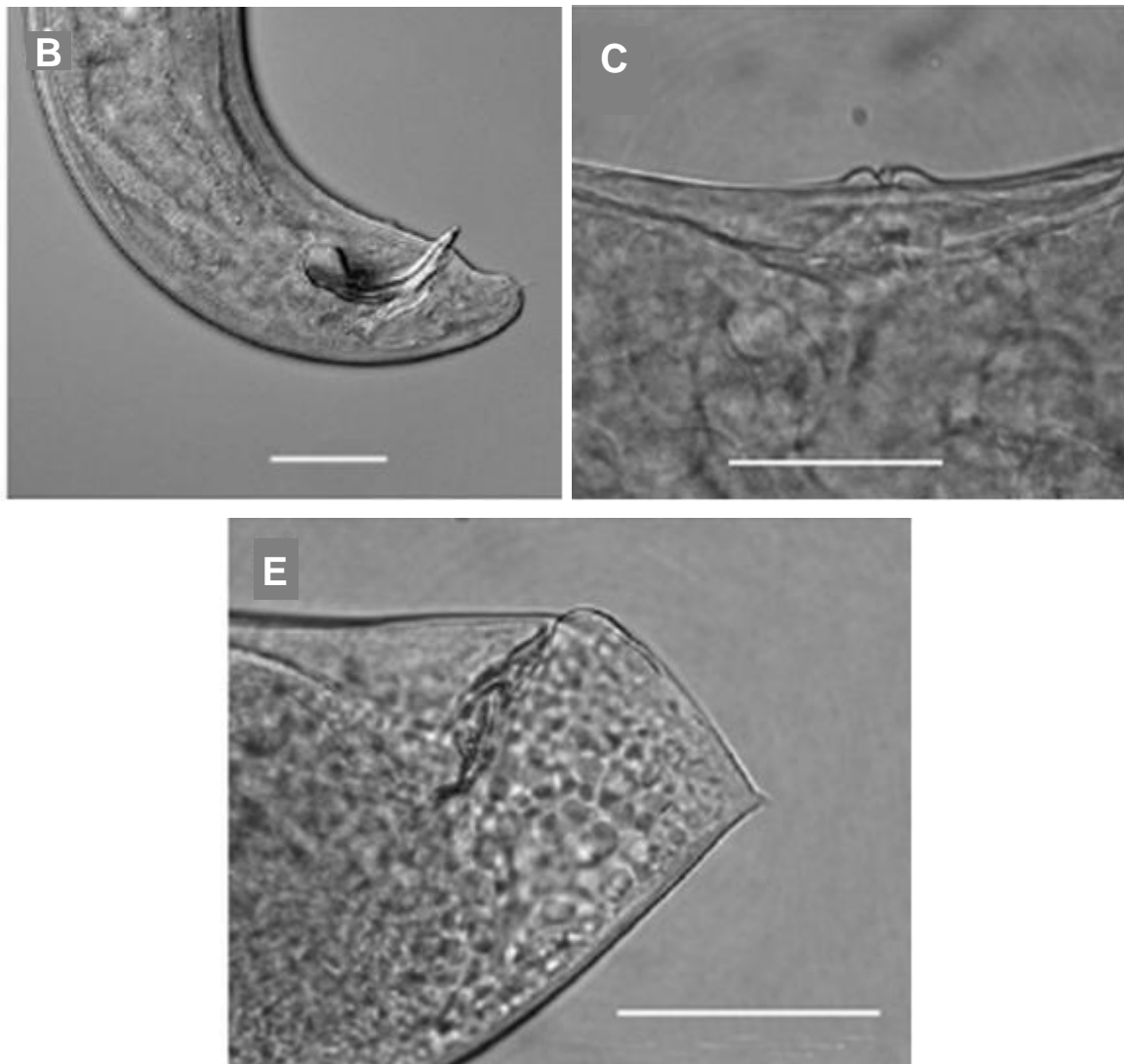


Figura 18. Aspecto de distintas estructuras de algunos estadios de desarrollo de *Steinernema cholashanense* bajo el microscopio de campo claro. B) región posterior de un macho mostrando espícula. C) vulva, y E) cola de hembra de primera generación (Tomado de Nguyen *et al.*, 2008)



3.3.1.2 Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)

Para este estudio también se prepararon muestras de adultos de primera generación y JI del NEP NH-1S. El diagnóstico mediante MEB fue el siguiente: los adultos presentaron seis labios fusionados (Figura 19C), cutícula lisa, y poro excretor visible (Figura 19C). Los machos no presentaron bursa, tiene 11 pares de papilas, cola corta y redondeada con mucron (Figura 19E). Los JI presentaron el extremo anterior completamente redondeado, con 4 papilas cefálicas, la abertura bucal cerrada (Figura 19A), cola filiforme, y con fasmidios (Figura 19B). Las estructuras presentadas en la Figura 19, son muy parecidas a las que frecuentemente son reportadas para nemátodos steinernemátidos (Figura 20), lo cual es evidencia de que el aislado NH-1S, muy probablemente sea una especie del género *Steinernema*.

Las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido, revelan características del NEP NH-1S que mediante la microscopía de campo claro no se pueden apreciar y viceversa, lo que hace necesario el uso de ambas técnicas para lograr la identificación de NEP's aislados. Esto ha sido realizado por diversos grupos de trabajo en investigaciones similares, entre los que destacan García-del Pino (1994), Qiu *et al.* (2004), Nguyen *et al.* (2006, 2008), Phan *et al.* (2006). Como se mencionó, tanto la microscopia de campo claro como la de barrido de electrones, indican que el NEP NH-1S posee las características necesarias para poder incluirlo dentro de la familia Steinernematidae, sin embargo aún no se puede proponer a que especie pertenece.

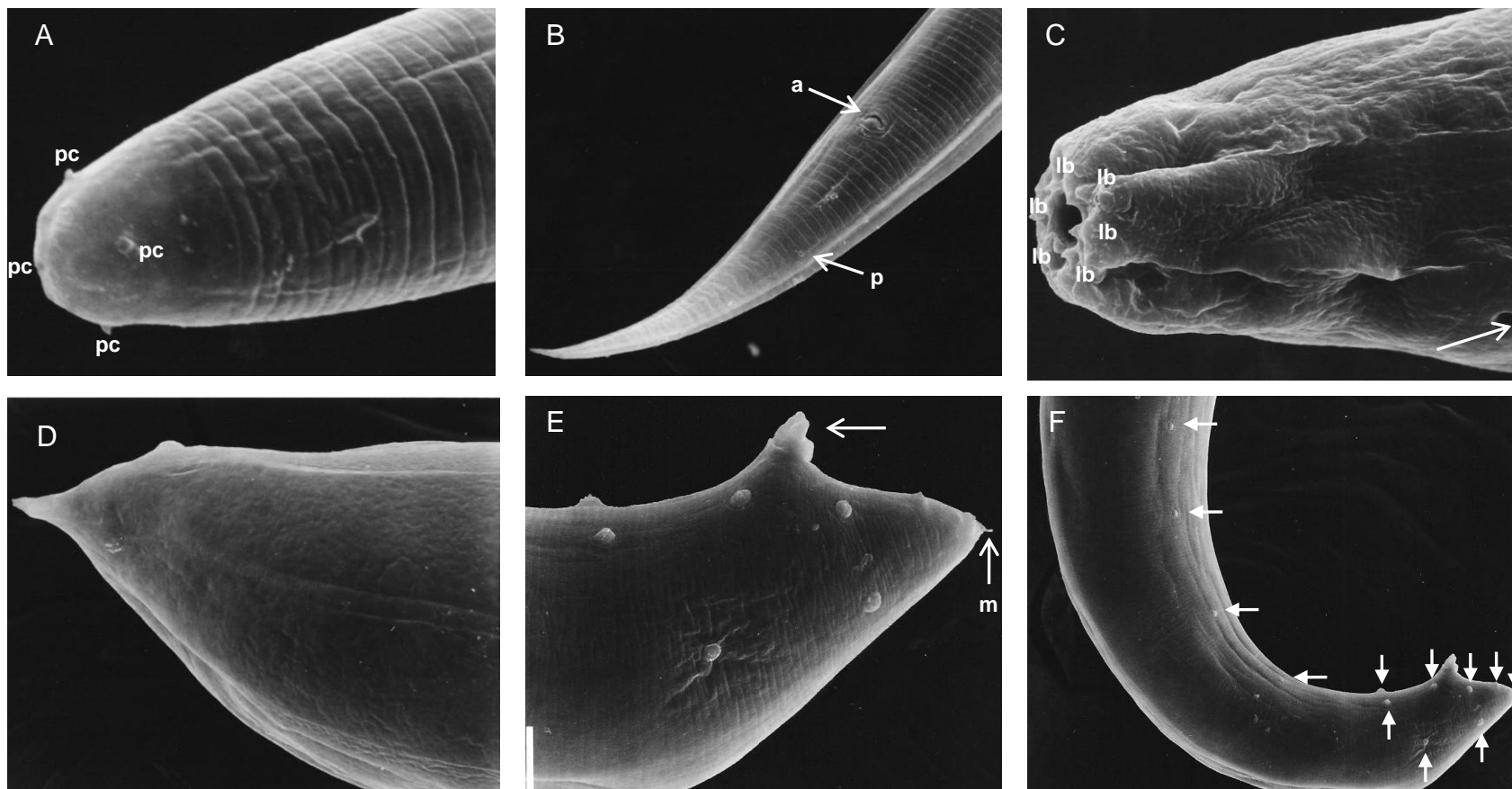


Figura 19. Aspecto de distintas estructuras de algunos estadios de desarrollo de steinernematodos NH-1S aislados en el Estado de Hidalgo, bajo el microscopio de barrido de electrones. Fases J1: A) región anterior mostrando las papilas cefálicas (pc), y B) región posterior mostrando el ano (a) y el fasmidio (p), región anterior (1,000 y 400 aumentos, respectivamente). Hembra adulta de primera generación: C) región anterior (vista lateral) mostrando labios fusionados (lb) y el poro excretorio (flecha), y D) región posterior mostrando la punta de la cola (vista lateral). Macho adulto de primera generación: E) región posterior (vista lateral) mostrando la espícula poco prominente (flecha) (probablemente debido a que el espécimen era aún joven) y el mucron (m), y F) región posterior (vista lateral) mostrando papilas precloacal, adcloacal y postcloacal (vista lateral).

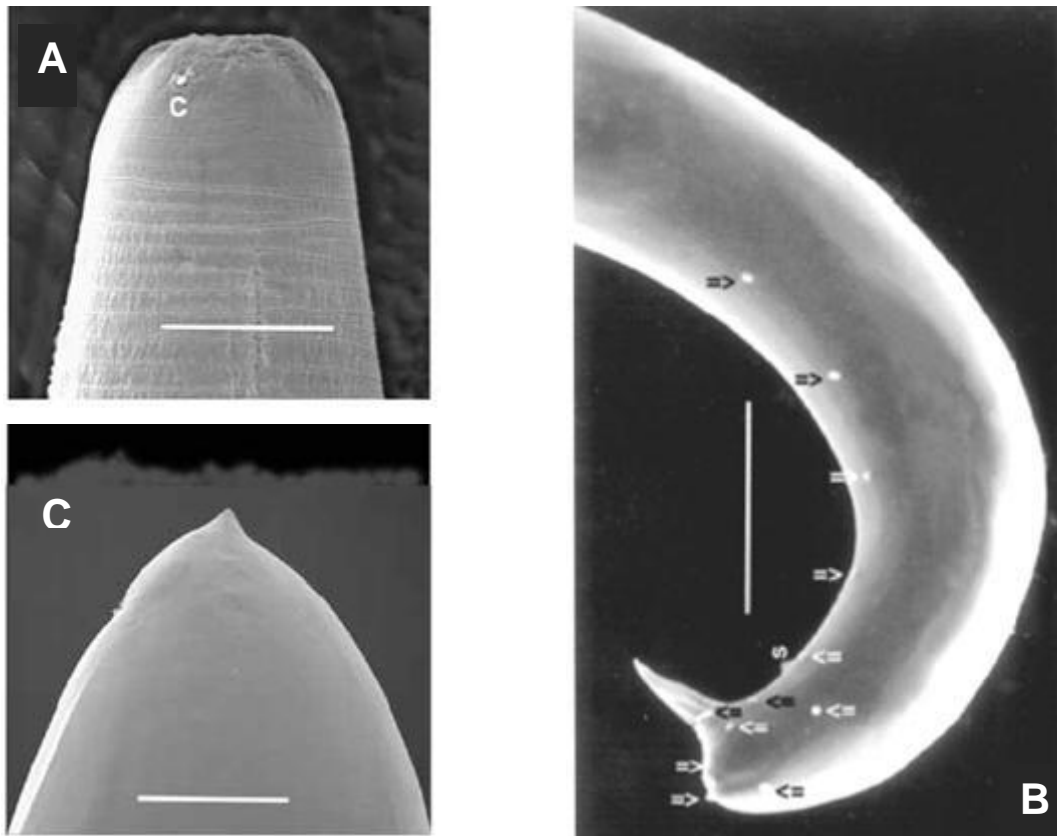


Figura 20. Aspecto de distintas estructuras de algunos estadios de desarrollo de steinernemátidos visualizados mediante microscopia de barrido de electrones. A) Región anterior de fase IJ de *Steiner nema guangdongense* mostrando la línea lateral (tomado de Qiu *et al.*, 2004). B) Región posterior de *S. riobrave* (tomado de Nguyen y Adams, 2003). C) Cola de una hembra joven de primera generación de *S. guangdongense* (tomado de Qiu *et al.*, 2004).



3.3.2 Morfometría

En el Cuadro 8 se muestran los resultados completos del estudio morfométrico realizado. La morfometría promedio de los JI del NEP NH-1S es: longitud total (LT), 593.19 μm ; anchura máxima (AM), 28 μm ; distancia de la cabeza al poro excretor (PE), 38.78 μm ; distancia de la cabeza al anillo nervioso (AN), 101.16 μm ; longitud del esófago (LE), 130.27 μm ; longitud de la cola (LC), 59.25 μm ; proporción "D" (PE/LE), 0.29; y proporción "E" (PE/LC), 0.65. Las claves morfométricas para los JI de *Steinernema* spp. (Poinar, 1990) (Anexo 3), sugieren que el nemátodo NH-1S aislado en el Estado de Hidalgo, corresponde a la especie *Steinernema carpocapsae*.

Cuadro 8. Morfometría fases Juveniles infectivas del NEP NH-1S aislado en la barranca de Metztlán, Alcholoaya, Hidalgo

Carácter	Longitud (μm) (n=25)*			
	Mínimo	Máximo	Promedio	$\pm\text{DE}^{**}$
Longitud total (LT)	495.71	691.86	593.19	46.30
Anchura máxima (AM)	25.62	30.50	28.00	1.44
Distancia cabeza-poro excretor (PE)	33.44	46.58	38.78	3.52
Distancia cabeza-anillo nervioso (AN)	85.28	116.58	101.16	6.97
Longitud del esófago (LE)	114.79	141.41	130.27	7.73
Longitud de la cola (LC)	51.39	72.27	59.25	5.14
Proporción "D" (PE/LE)	0.24	0.35	0.29	0.02
Proporción "E" (PE/LC)	0.52	0.86	0.65	0.08

* n, muestras. ** Desviación estándar

La especie *S. carpocapsae* fue descrita como *Neoplectana carpocapsae* por Weiser (1955) en Checoslovaquia y después fue redescrita y reportada varias veces para diferentes regiones del holártico por Poinar (1967). El NEP *S. carpocapsae* está ampliamente distribuido alrededor del mundo y ha sido



encontrado en regiones como: Europa, América del Norte, América del Sur, Australia y Nueva Zelanda (Poinar, 1990).

Shishiniova *et al.* (1998), reportaron 3 NEP's aislados en suelos de Bulgaria (Cuadro 9), identificados como *S. carpocapsae*, los cuales presentaron las siguientes características morfométricas: longitud total promedio, 562.35, 586.3 y 613.6 μm ; anchura máxima promedio: 24.55, 25.01 y 25.89 μm ; distancia promedio de la cabeza al poro excretor: 40.28, 41.05 y 41.4 μm ; distancia promedio de la cabeza al anillo nervioso: 76.2, 81.75 y 84.39 μm ; longitud promedio del esófago: 113.3, 125.5 y 133.1 μm ; longitud promedio de la cola: 45.65, 53.8 y 58.3 μm ; proporción "D": 0.31, 0.32 y 0.35; y proporción "E": 0.71, 0.76 y 0.88. Vale la pena mencionar que de los tres aislados, Shishiniova *et al.* (1998) describe a la cepa BVC 02 atípica como "anormal", la cual presenta una forma redondeada en la punta de la cola. La Figura 21 muestra la cola "normal" de un JI de *S. carpocapsae*, cepa BVC 01, y la cola "anormal" de los JI de *S. carpocapsae*, cepa BVC 02. Cabe mencionar que este tipo de figuras realizadas a mano alzada, son usadas con frecuencia al igual que fotografías tomadas bajo el microscopio de campo claro, en trabajos donde se estudia la taxonomía y morfología de los NEP's.

Poinar (1990), menciona que los JI de *S. carpocapsae* pueden ser reconocidos por la longitud total de su cuerpo (promedio = 558 μm ; rango = 438-650 μm), la posición anterior del poro excretor y una pequeña proporción "E" (promedio = 0.60; rango = 0.54-0.66) (Cuadro 9).

Las dimensiones de fases JI del nemátodo aislado NH-1S, resultaron relativamente similares a lo que reportan Shishiniova *et al.* (1998) y Poinar (1990) en descripciones de NEP's steinernemátidos aislados, como se describe a continuación: la longitud total del NEP NH-1S es prácticamente la misma que la de *S. carpocapsae* (Weiser) (Poinar, 1990) ($LT_{\text{NH-1S}}/LT_{\text{S.c. (Weiser)}} = 593.19/558 = 1.06$ veces), y la cepa BVC 01 (Shishiniova *et al.*, 1998) ($LT_{\text{NH-1S}}/LT_{\text{BVC 01}} =$



593.19/613.6 = 0.96 veces); la anchura máxima es similar que la reportada para aislados de Shishiniova *et al.* (1998) ($AM_{NH-1S}/AM_{BVC\ 01, BVC\ 02, BZC\ 03} = 28/25.01, 25.89, 24.55 = 1.11, 1.08, 1.14$ veces) y Poinar (1990) ($AM_{NH-1S}/AM_{S.c. (Weiser)} = 28/25 = 1.12$ veces); la distancia de la cabeza al poro excretor también es similar a la de las cepas reportadas por Shishiniova *et al.* (1998) ($PE_{NH-1S}/PE_{BVC\ 01, BVC\ 02, BZC\ 03} = 38.78/41.4, 40.28, 41.05 = 0.93, 0.96, 0.94$ veces), y es casi la misma que la reportada por Poinar (1990) ($PE_{NH-1S}/PE_{S.c. (Weiser)} = 38.78/38 = 1.02$ veces); lo mismo ocurre con la longitud del esófago de *S. carpocapsae* (Weiser) (Poinar, 1990) ($LE_{NH-1S}/LE_{S.c. (Weiser)} = 130.27/120 = 1.08$ veces) y las cepas BVC 02, BZC 03, a excepción de la cepa BVC 01 (Shishiniova *et al.*, 1998) ($LE_{NH-1S}/LE_{BVC\ 01, BVC\ 02, BZC\ 03} = 130.27/133.1, 113.3, 125.5 = 0.98, 1.14, 1.03$ veces). Finalmente, la longitud de la cola del NEP NH-1S también es similar a la reportada por Shishiniova *et al.* (1998) ($LC_{NH-1S}/LC_{BVC\ 01, BVC\ 02, BZC\ 03} = 59.25/58.3, 45.65, 53.8 = 1.01, 1.29, 1.10$ veces) y Poinar (1990) ($LC_{NH-1S}/LC_{S.c. (Weiser)} = 59.25/53 = 1.11$ veces).

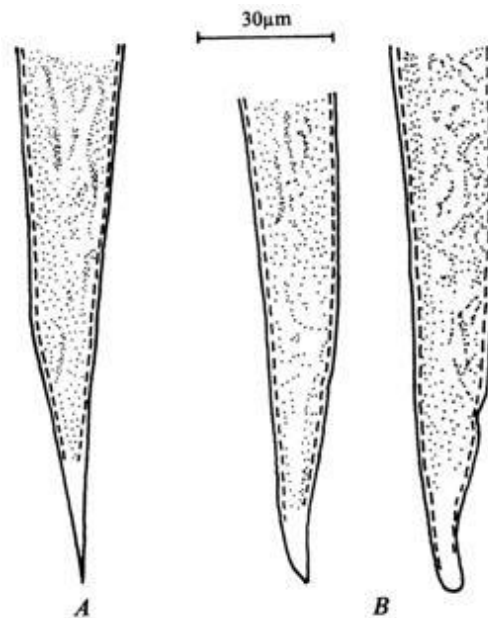


Figura 21. Infectivos juveniles de *S. carpocapsae*: A) Cola "normal", cepa BVC 01; B) Cola "anormal", cepa BVC 02 (Shishiniova *et al.*, 1998).



Por otra parte, las proporciones “D” (PE/LE) y “E” (PE/LC) también indican similitudes morfométricas entre el NEP NH-1S y los descritos por Shishiniova *et al.* (1998) (proporción “D”_{NH-1S}/proporción “D”_{BVC 01, BVC 02, BZC 03} = 0.29/0.31, 0.35, 0.32 = 0.93, 0.82, 0.90 veces; proporción “E”_{NH-1S}/proporción “E”_{BVC 01, BVC 02, BZC 03} = 0.65/0.71, 0.88, 0.76 = 0.91, 0.73, 0.85 veces), así como con *S. carpocapsae* (Weiser) reportado por Poinar (1990) (proporción “D”_{NH-1S}/proporción “D”_{S.c.(Weiser)} = 0.29/0.26 = 1.11 veces; proporción “E”_{NH-1S}/proporción “E”_{S.c.(Weiser)} = 0.65/0.60 = 1.08 veces).

Tomado como base que las claves morfométricas para la identificación de JI de *Steinernema* spp. sugeridas por Poinar (1990) son convenientes, la comparación de los resultados morfométricos obtenidos para el NEP NH-1S y las cepas aisladas por Shishiniova *et al.* (1998) y *S. carpocapsae* (Weiser) (Poinar, 1990), sugieren que el nemátodo NH-1S aislado en la barranca de Metztlán, Alcholoaya, Hidalgo, pertenece a la especie *S. carpocapsae*.



Cuadro 9. Morfometría de JI de *Steinernema carpocapsae* (longitudes y proporciones en μm)

Cepa BVC 01 (n=25)	Cepa BVC 02 (n=25)
<i>(Shishiniova et al., 1998)</i>	<i>(Shishiniova et al., 1998)</i>

Carácter

	Mínimo	Máximo	Promedio	±DE	Mínimo	Máximo	Promedio	±DE
Longitud total (LT)	568	643	613.6	20.73	520	622.5	662.35	24.98
Anchura máxima (AM)	23	26	25.01	0.84	22.5	27.5	25.89	1.41
Distancia cabeza-poro excretor (PE)	37	46	41.4	1.89	37.5	44	40.28	1.95
Distancia cabeza-anillo nervioso (AN)	77	92	84.39	3.5	67.5	85	76.2	4.44
Longitud del esófago (LE)	123	143	133.1	5.15	102.5	130	113.3	8.49
Longitud de la cola (LC)	48	63	58.3	3.07	40	55	45.65	4
Proporción " D" (PE/LE)	0.29	0.32	0.31	0.01	0.30	0.38	0.35	0.01
Proporción " E" (PE/LC)	0.65	0.76	0.71	0.02	0.74	1.00	0.88	0.06



3.3.3 Caracterización molecular

Debe resaltarse que los primers usados en el presente trabajo y propuestos por Vrain en 1992, son altamente conservados y fueron propuestos con base en una analogía con el cistron ribosomal de *Caenorhabditis elegans*, el cual es por cierto, el único nemátodo completamente secuenciado hasta la fecha. Los estudios de biología molecular del NEP NH-1S se llevaron a cabo en el CINVESTAV-IPN, Unidad Irapuato. En esta parte del trabajo también se anexan los resultados obtenidos de la caracterización molecular del mismo NEP, que de forma paralela se realizó en el Centro de Investigación de Recursos Naturales (CIRN) de la Universidad de AZORES, Portugal.

En la Figura 22, se muestran las fotografías de los geles de agarosa 1% p/v realizados para verificar la concentración e integridad del ADN extraído del NEP NH-1S (A) y la concentración de los fragmentos de ADN amplificados (B).

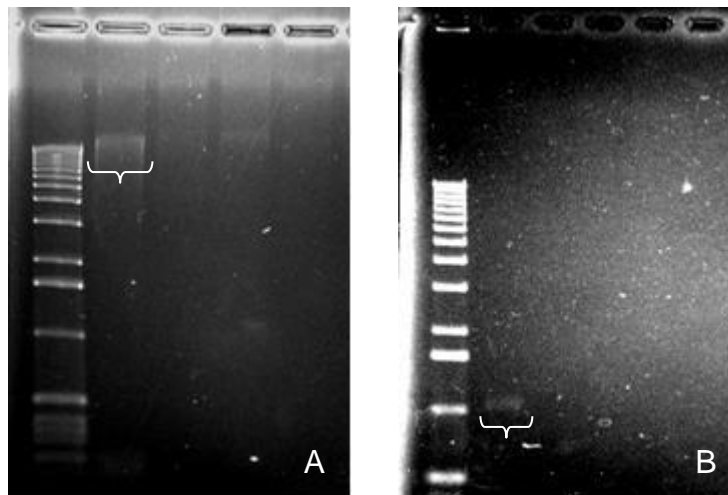


Figura 22. Geles de agarosa al 1% p/v del ADN aislado y amplificado, del NEP NH-1S. A) ADN aislado; B) ADN amplificado por PCR.

En ambos geles de la Figura 22, el primer pozo de izquierda a derecha se utilizó para cargar el marcador molecular (1 kb DNA Ladder, GIBCO BRL) y el segundo para cargar el ADN aislado y fragmentos amplificados de ADN del NEP



NH-1S, respectivamente. En la Figura 22A, se puede observar que el ADN aislado forma una banda clara pero definida, lo que indica que hay suficiente material genético para poder realizar la PCR. La longitud del fragmento amplificado de ADN fue de 1,018 pares de bases (pb) aproximadamente, el cual se encuentra dentro del esperado (1,000 a 1,100 pb); ésto se puede comprobar si comparamos la distancia recorrida por la banda del problema con las bandas del marcador de peso molecular conocido (Figura 24) (Anexo 1.2). Por otra parte, los fragmentos amplificados de ADN formaron una banda tenue (Figura 22B) indicando que la concentración de los fragmentos amplificados era baja, lo que nos llevó a realizar una medición de absorbancia a 260 nm, para determinar cuantitativamente la cantidad de fragmentos amplificados de ADN, obteniéndose un valor de concentración de 105 ng/μL (nanogramos de producto PCR por microlitro de muestra), la cual es una cantidad suficiente para secuenciar (para estos fines se requiere al menos contar con 50 ng/μL de ADN). Los productos obtenidos de la PCR listos para su secuenciación, fueron enviados para su procesamiento al Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad en el CINVESTAV-IPN, Unidad Irapuato. Posteriormente los resultados obtenidos de la secuenciación (Figura 23) fueron comparados en el GEN BANK del Centro Nacional de Información Biotecnología (NCBI por sus siglas en inglés) con secuencias de *Steinernema* usando BLAST, pagina web www.ncbi.nlm.nih.gov.

Los resultados de la comparación de las secuencias obtenidas de material genético del NEP NH-1S con secuencias de *Steinernema* de la base de datos del GEN BANK se muestran en el Cuadro 10. Con la secuencia **S1** (Figura 23), se encontró un 99% de homología del NEP NH-1S, con *Steinernema carpocapsae* cepa All y *Steinernema carpocapsae* variedad “europea” con los números de acceso “**AF331913.1**” y “**AY171283.1**”, respectivamente, mientras que con la secuencia **S2**, el porcentaje de homología fue de 100% con *Steinernema carpocapsae* variedad “europea”, con el número de acceso “**AY171283.1**”.



Cuadro 10. Homología con base a las secuencias del NEP NH-1S amplificadas, con las reportadas en base de datos del GEN BANK del NCBI

Secuencia (Figura 23)	% Homología	Especie	No. Acceso
S1	99%	<i>S. carpocapsae</i> All	AF331913.1
	99%	<i>S. carpocapsae</i> europea	AY171283.1
S2	100%	<i>S. carpocapsae</i> europea	AY171283.1

S1
 5' – TTTCKTTTCKCCGCTTMYGAATNNCCTTAAGTTCAGCGGGTAATCTTGCTCRRRYGAGGKCTAGTTSGRAAAGA
 TTMGCAGAGCATAGCACAATTGACCGACAAATCAAGTCAGAAAACCACATTGATTAATGAGCTGACTTTAAGAAAC
 GTATTACACTTGCTTGTAAGTCAAGTTCAGTTCAGCAAGAAACGCGCTAAACCATTAATCAAACACTACGCAATGCCAAA
 TGATTGCAGACGTCTAGCAAAGAAACAGCTAGCCAGACATCCATTAGACAATCAAATAGCCATACCGAAAAGGTAC
 TTCACAAAAGCAAAGTAGCTTACCGAAAAGCAATCACAGCCGATTGCCAGATTCTAGTCAAAGACCCTCAATTG
 AACATACTAACAAATAAAAACCTGTTAGTGCCATTTGCGTTCAAATTTTAGCGCTCAATATGTCTGCAATTCACGC
 CAAATAACGGTTTTTGCCCGTTTTTCATCGACCTACGAACCGAGTGATCCACCGATAAGACTTGATAATTAATAAAA
 TGCATCAACGAGTGACACAATTATCGAAACAAAACGTTTTTGTAGCAATCAAAGAATGGCGAGTCAGCAGACCTC
 TTTAATTCTCATCACTAAGCATTCAAGAAACGACGAAACGCTTAGATAACAATGTACAATGTTTCATCAGCACAGTCA
 CGCTCATACAACTGCTCCAAACATCTGTAGAAACCTTTCAAAGCCGTTAGAGATCAAAGTTAAAGCTTAGAAACGAA
 CAGCGAAAACCTTGATTAATAAGGAAAATATTAGCTCAATAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAACCTTGTT
 ACGACTTTTGCCCGTTCAAGCCGATTGATTAAYKYGSTYYTSGCRWCAAWGACCGWMYGAWARCGWKCAAC
 ATYGCAAYCTCCGCTKWCWC – 3'

S2
 5' – TTTTTATATTAGTCTGCCTTGACACCACCGCGTGCCTGCCCGGGACTGAGTTGTTTCGAGAAAAGCGGAGAT
 TGCGATGTTGAACGTTTTTCGGACGGTCTTTGTTGCGAGAACCAGCGTTAATCGAATCGGCTTGAACCGGGCAAAG
 TCGTAACAAGGTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAGCTAATATTTTCTTTTAAATCAAGTTTTT
 GCTGTTTCGTTTCTAAGCTTAACTTGATCTCTAACGGCTTTGAAAGGTTTCTACAGATGTTTGGAGCAGTTGTATGA
 GCGTGACTGTGCTGATGAACATTGTACATTGTTATCTAAGCGTTTCGTCGTTTCTTGAATGCTTAGTGATGAGAATT
 AAAGAGGTCTGCTGACTCGCCATTCTTTGATTGCTAACAAAACGTTTTGTTTCGATAATTGTGTCACTCGTTGATG
 CATTTTTAATTATCAAGTCTTATCGGTGGATCACTCGGTTTCGATAGGTCGATGAAAACGGGGCAAACCGTTATT
 TGCGTGAATTGCAGACATATTGAGCGCTAAAATTTGAACGCAAATGGCACTAACAGGTTTTTATCTGTTAGTATG
 TTCAATTGAGGGTCTTTGACTAGAATCTGGCAATCGGCTGTGATTGCTTTTTCGGTAAGCTACTTTGCTTTTGTGA
 AGTACCTTTTCGGTATGGCTATTTGATTGTCTAATGGATGTCTGGCTAGCTGTTTCTTTGCTAGACGCTGCAATC
 ATTTGGCATTGCGTAGTGTTGATTAATGGTTTAGCGGTTTTCTGCTAACTGACTTTTACACAAGCAAGTGTAAAT
 ACGTTTTCTAAAGTCAGCTCATTAAATCAATGTGGTTTTCTGACTTGATTTGTCGGTCAATTGTGCTATGCTCTGCTA
 ATCTTTTCGAACTAGACCTCAATTTGAGCAAGATTACCGCTGAACCTAAGCATATCAGTAAGCGGAGGAAAAGAA
 ACAA – 3'

Figura 23. Secuencias de fragmentos de ADN amplificados del nemátodo entomopatógeno NEP NH-1S aislado en la barranca de Metztlán, Alcholya, Hidalgo. **S1**, secuencia obtenida en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad, Irapuato, Guanajuato; **S2**, secuencia obtenida en el Centro de Investigación de Recursos Naturales (CIRN) de la Universidad de Azores, Portugal (el material genético usado en esta secuenciación se obtuvo mediante PCR usando los primers 18S y 26S de Vrain *et al.*, 1992).



Diversos autores han redescrito o identificado alguna nueva especie de nemátodo entomopatógeno (Stock *et al.*, 1998; Nguyen y Duncan, 2002; Ivanova y Spiridonov, 2003; Nguyen *et al.*, 2004; Qiu *et al.*, 2004; Nguyen *et al.*, 2006; Phan *et al.*, 2006; Nguyen *et al.*, 2008), apoyándose de técnicas tradicionales como la morfología o la morfometría, pero, la biología molecular se ha convertido en una herramienta complementaria y necesaria para poder definir a que especie pertenecen los nuevos aislados de NEP's. Como se mencionó en el Capítulo 1, el rDNA puede proporcionar marcadores genéticos útiles para estudiar especies de nemátodos entomopatógenos, tal es el caso de los ITS (Gasser, 2001) que parecen ser marcadores fiables para la identificación de especies dentro de cada género de NEP's (Pamjav *et al.*, 1999). En el presente trabajo, el uso de los ITS para la identificación del NEP NH-1S aislado en la barranca de Metztlán, Alcholoya, Hidalgo, indican que pertenece a la especie *Steinernema carpocapsae*, lo cual confirma lo que ya se venía incubando con base a los estudios morfométricos ya discutidos. Y esto es de gran relevancia, ya que aunque no es una especie nueva la reportada en el este estudio, si es el primer reporte de aislamiento de esta especie en el Estado de Hidalgo, y ésta pudiera ser una variedad nueva con ventajas potenciales aún por desvelarse en estudios futuros.



Capítulo 4

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados presentados del aislamiento e identificación de nemátodos entomopatógenos en algunas zonas del Estado de Hidalgo, se puede concluir lo siguiente;

- a) El aislamiento de nemátodos entomopatógenos fue positivo: se pudo aislar un total de 38 especímenes de muestras de suelo, de los cuales 16 aislados resultaron ser del género *Steinernema* y 22 del género *Heterorhabditis*.
- b) Se encontraron nemátodos entomopatógenos, incluso en hábitats con condiciones aparentemente desfavorables. El alto porcentaje de abundancia de NEP ($38/165 \times 100 = 23\%$) en las zonas examinadas, indica que es posible aislar nemátodos entomopatógenos en suelos bajo condiciones extremas de pH ($3.68 < \text{pH} < 7.95$ para steinernemátidos y $4.91 < \text{pH} < 8.49$ para heterorhabdítidos) y humedad (steinernemátidos de 5.7% a 59.7% y heterorhabdítidos de 11.9% a 48.6%).



- c) Se logró la identificación a nivel de especie de un nemátodo entomopatógeno aislado durante esta investigación. El análisis combinado de las características morfológicas, morfométricas y biomoleculares, permitieron la identificación del nemátodo NEP NH-1S, aislado en la barranca de Metztlán, Alcholoaya, Hidalgo, como *Steinernema carpocapsae*.
- d) Aunque las evidencias sugieren que el nemátodo NH-1S pertenece a la especie *Steinernema carpocapsae*, se presume que el aislado pudiese pertenecer a una variedad no reportada anteriormente. No obstante, se deben realizar más estudios para determinar esta posibilidad, probablemente a través del uso de otros marcadores moleculares.



Capítulo 5

RECOMENDACIONES PARA TRABAJOS FUTUROS

Tomando como base los resultados obtenidos en el presente estudio, se sugieren lo siguiente para investigaciones por realizarse en el corto plazo:

- a) Realizar bioensayos con fases juveniles infectivas de los NEP aislados para determinar su patogenicidad contra distintas larvas de insectos plaga de la región.
- b) Continuar con los estudios morfológicos, morfométricos y moleculares de los restantes nemátodos aislados en el presente estudio para lograr su identificación a nivel de especie.
- c) Completar el estudio de factores abióticos en las muestras de suelo que dieron positiva la presencia de nemátodos entomopatógenos, considerando, por ejemplo, % humedad relativa imperante, la temperatura del suelo, % de materia orgánica, así como la posición geográfica de las muestras de suelo colectadas, entre otros.



Capítulo 6

ANEXOS

1. Electroforesis en gel

La electroforesis en gel es un método que se emplea para separar macromoléculas en función del tamaño, la carga eléctrica y otras propiedades físicas. El término electroforesis describe la migración de las partículas cargadas bajo la influencia de un campo eléctrico. “Electro” se refiere a la electricidad y “foresis”, del griego *phoros*, significa “trasladar”. Así, pues la electroforesis en gel es una técnica consistente en aplicar corriente eléctrica a las moléculas para que atraviesen una placa de gel (Westermeier, 1997). La electroforesis en gel de agarosa es un método normalizado que se utiliza para separar, identificar y purificar fragmentos de ADN. Se trata de una técnica sencilla y rápida que permite diferenciar fragmentos de ADN que no pueden separarse adecuadamente con otros procedimientos. Por otra parte, el ADN puede localizarse en el gel tiñendo con una concentración baja de bromuro de etidio, que es un agente intercalante fluorescente que se utiliza como colorante.



1.1 Principios físicos de la electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis en gel es una técnica que se emplea para separar los ácidos nucleídos y las proteínas. La separación de las macromoléculas depende de dos variantes: carga y masa. Cuando una muestra biológica, como por ejemplo el ADN, se mezcla en una solución tampón y se aplica a un gel, esas dos variables actúan conjuntamente. La corriente eléctrica de un electrodo repele las moléculas, al tiempo que el otro electrodo las atrae. La fuerza de fricción del material de gel actúa como “tamiz molecular”, separando las moléculas en función de su tamaño (Sambrook *et al.*, 1989)

1.2 Componentes de la electroforesis en gel de agarosa

Agarosa: coloide natural que se extrae de las algas. La agarosa es muy frágil y las manipulaciones pueden destruirla con facilidad. Los geles de agarosa poseen grandes “poros” y se emplean fundamentalmente para separar las moléculas grandes con un peso molecular de más de 200 kDa; permiten una electroforesis rápida, pero con una resolución limitada por cuanto las bandas que se forman en los geles tienen tendencia a ser difusas y a esparcirse. Ello obedece al tamaño de los poros y no puede controlarse. Los geles de agarosa se obtienen por suspensión de agarosa seca en polvo en un tampón acuoso, tras lo cual se hace hervir la mezcla hasta tener una solución transparente. A continuación, se vierte esta solución en un molde para gel y se deja enfriar a temperatura ambiente hasta que se forma un gel rígido. Al endurecerse, la agarosa forma una matriz cuya densidad viene determinada por su concentración.

Tampones de electroforesis: la movilidad electroforética del ADN se ve afectada por la composición y la fuerza iónica del tampón de electroforesis. En ausencia de iones, la conductancia eléctrica es mínima y el ADN migra lentamente o ni siquiera se desplaza. En un tampón de elevada fuerza iónica la conductancia eléctrica es muy elevada y se genera una importante cantidad de calor. En el peor



de los casos, el gel se funde y el ADN se desnaturaliza. Se dispone de varios tipos de tampones para la electroforesis de ADN nativo bicatenario: contienen EDTA (pH 8.0) y tris-acetato (TAE), tris-borato (TBE) o tris-fosfato (TPE) a una concentración de aproximadamente 50 mM (pH 7.5 – 7.8). Los tampones de electroforesis suelen prepararse en forma de soluciones concentradas y se conservan a temperatura ambiente. El TAE 10x (108 g/L de Tris Base, 55 g/L ácido acético, 9.3 g/L EDTA; pH 8.0) se utilizaba inicialmente a una concentración de trabajo de 1x (1 volumen de TAE 10x en 9 volúmenes de agua) en el caso de la electroforesis en gel de agarosa.

Concentración de agarosa: un fragmento de ADN de un tamaño determinado migra a diferentes velocidades a través de los geles según la concentración de agarosa. En función de la concentración de agarosa o tampón, se pueden separar segmentos de ADN que contengan de 20 a 50,000 pb (pares de bases). En los geles horizontales, la agarosa se emplea por lo general en concentraciones comprendidas entre 0.7% y 3% (Cuadro 11).

Cuadro 11. Concentración recomendada de gel de agarosa para separar moléculas de ADN lineales.

% de agarosa	Tamaños de ADN (pb)
0.75	10 000 – 15 000
1.0	500 – 10 000
1.25	300 – 5 000
1.5	200 – 4 000
2.0	100 – 2 500
2.5	50 – 1 000

ADN marcador: para un gel de agarosa y unas concentraciones de tampón determinadas, la distancia de migración depende del peso molecular del material inicial. Así pues, debe cargarse un ADN marcador de tamaño conocido en las ranuras situadas en los extremos derecho e izquierdo del gel. Generalmente un



marcador contiene un número determinado de segmentos de ADN conocidos (Figura 24), lo cual facilita la labor de determinar el tamaño de los ADN desconocidos en caso de que se produjese alguna distorsión sistemática del gel durante la electroforesis.

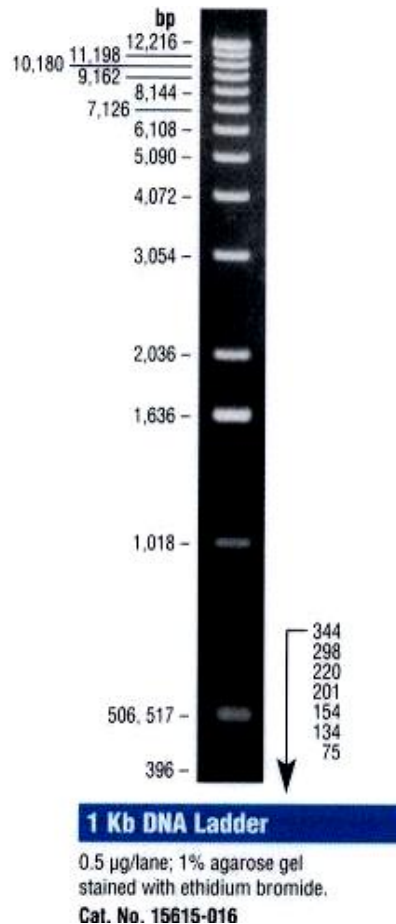


Figura 24. Escalera de 1 kb de ADN, GIBCO BRL. Representación del marcador usado, que expresa el número de pares de bases correspondientes para cada banda.

Tampón de carga: las muestras de ADN que deben cargarse en el gel de agarosa se mezclan en primer lugar con un tampón de carga que por lo general contiene agua, sacarosa y un colorante (por ejemplo cianol de xileno, azul de bromofenol, verde de bromocresol, entre otros). La cantidad máxima de ADN que puede cargarse depende del número de fragmentos. La cantidad mínima de ADN



que puede detectarse mediante fotografía de los geles teñidos con bromuro de etidio es de aproximadamente 2 ng en una banda de 0.5 cm de ancho. Si una banda de este ancho contiene más de 500 ng de ADN, la ranura estará sobrecargada y se producirá un emborronamiento. El tampón de carga se emplea con tres fines:

- Aumentar la densidad de las muestras para que las gotas de ADN caigan uniformemente en el pocillo.
- Añadir color a la muestra, simplificando de este modo el proceso de carga.
- Incorporar un colorante a la muestra que, en un campo eléctrico, se desplace hacia el ánodo a una velocidad previsible.

2. Cuantificación de ADN

Para la cuantificación del ADN, existen dos métodos indirectos que permiten estimar la concentración del ADN en las muestras, por visualización y mediante espectrofotómetro.

2.1 Estimación de la concentración de ADN por visualización

El método indirecto más recomendable para la determinación de la concentración de ADN en una muestra es mediante la visualización de un gel de electroforesis. El procedimiento requiere la preparación de una cámara de electroforesis, colocando cada una de las muestras que se desea evaluar en pozos individuales.

Posteriormente se inicia la electroforesis a 80 V. La electroforesis finaliza cuando el tampón de carga recorre 2/3 de la distancia del gel, se detiene la fuente de poder, se destapa la cámara de electroforesis y finalmente se visualiza el producto con luz U.V. y se toma una fotografía. En este método la estimación se realiza contrastando intensidades de luz entre las muestras, lo cual se realiza



visualmente o con el auxilio de algún programa computacional que contraste intensidades de color.

2.2 Estimación mediante espectrofotómetro

En este método se utiliza un espectrofotómetro para medir la absorbancia (entre 260 nm y 280 nm). Se enciende el espectrofotómetro al menos 15 min antes de iniciar las lecturas.

Preparación del blanco: agregar 1,000 μL de agua destilada en una celda, colocar la celda en la posición 1 del espectrofotómetro.

Preparación de las muestras: agregar 1 μL de la muestra problema y 999 μL de agua destilada en otra celda, asegurándose que se homogenicen perfectamente.

Lectura: para la lectura sólo se tiene que responder con el teclado del equipo las preguntas que aparecen en pantalla. El equipo permite evaluar la concentración de proteínas (limpieza de la muestra), presencia de ARN y concentración de oligos (ADN degradado).

3. Clave para las fases infectivas de *Steinernema* spp. según Poinar (1990) (Todas las unidades están expresadas en μm)

1. Longitud media de las fases infectivas mayor de 1000 (rango = 724-1500) ----- 2
- 1'. Longitud media de las fases infectivas menor de 1000 (rango = 438-1200) ----- 3
2. Distancia media de la cabeza al poro excretor de 87-110; proporción "D" varia de 0.58-0.71 ----- *S. glaseri* (Steiner).
- 2'. Distancia media de la cabeza al poro excretor de 76-86; proporción "E" varia de 0.52-0.59 ----- *S. anomali* (Kozodoi).
3. Longitud media de las fases infectivas de 800-900



- (rango = 736-950) ----- *S. feltiae* (Filipjev).
- 3'. Longitud media de las fases infectivas menor de 800
(rango = 438-800) ----- 4
4. Longitud media de las fases infectivas de 660-700
(rango = 608-800) ----- 5
- 4'. Longitud media de las fases infectivas de 500-600
(rango = 438-662) ----- 6
5. Con espina refractiva en el extremo de la
cola ----- *S. affinis* (Bovien).
- 5'. Sin espina refractiva en el extremo de la
cola ----- *S. intermedia* (Poinar).
6. Longitud media del esófago de 115-127
(rango = 103-190) ----- 7
- 6'. Longitud media del esófago de 102-111
(rango = 89-120) ----- 8
7. Proporción "E" de 0.73
(rango = 0.60-0.80) ----- *S. scapterisci* (Nguyen y Smart).
- 7'. Proporción "E" de 0.60
(rango = 0.54-0.66) ----- *S. carpocapsae* (Weiser).
8. Distancia media de la cabeza al poro excretor de 38,
rango = 32-40; longitud media de las fases infectivas de 511,
rango = 443-573; proporción "D" = 0.35
(rango = 0.30-0.39) ----- *S. rara* (Doucet).
- 8'. Distancia media de la cabeza al poro excretor de 46,
rango = 42-50; longitud media de las fases infectivas de 589,
rango = 524-662; proporción "D" = 0.41
(rango = 0.38-0.44) ----- *S. kushidai* (Mamiya).



Capítulo 7

REFERENCIAS

Adams BJ, Burnell AM y Powers TO (1998) A phylogenetic analysis of *Heterorhabditis* (Nemata: Rhabditidae) based on internal transcribed spacer 1 DNA sequence data. *Journal of Nematology*, 30: 22 – 39.

Adams BJ y Nguyen KB (2002) Taxonomy and Systematics. En *Entomopathogenic nematology*. R Gaugler (Editor) CABI Publishing. Department of Entomology, Rutgers University, New Brunswick, New Jersey, USA. Pp. 1 – 33.

Anis M, Shahina F, Reid AP y Maqbool MA (2000) Biogeography. En *Entomopathogenic nematology*. R Gaugler (Editor) CABI Publishing. Department of Entomology, Rutgers University, New Brunswick, New Jersey, USA. Pp. 115 – 143.

Barker CW y Barker GM (1998) Biogeography. En *Entomopathogenic nematology*. R Gaugler (Editor) CABI Publishing. Department of Entomology, Rutgers University, New Brunswick, New Jersey, USA. Pp. 115 – 143.

Bedding RA (1984) Large scale production, storage and transport of the insect parasitic nematodes *Neoplectana* and *Heterorhabditis* spp. *Annals of Applied Biology*, 104: 117 – 120.

Bioagro - Soluciones Biológicas (2008) Nematodos entomopatógenos. http://www.bioagro.com.co/joomla/index.php?option=com_content&task=view&id=26&Itemid=9. Último acceso 27 de Noviembre de 2008.



- Blaxter ML (2001) Capítulo 1. Molecular analysis of nematode evolution. En *Parasitic nematodes; molecular biology, biochemistry and immunology*. Kennedy MW, Harnett W (Editores). CABI Publishing, New York, USA. Pp. 1 – 24.
- Blaxter ML, De Ley P, Garey JR, Liu LX, Scheldeman P, Vierstraete A, Vanfleteren JR, Mackey LY, Dorris M, Frisse LM, Vida JT, Thomas WK (1998) Capítulo 2. Control biológico. En *El estrés calórico en la expresión de las proteínas HSP70 y HSP90 en nemátodos entomopatógenos* (Rhabditida: Steinernematidae, Heterirhabditidae). Lozano-Gutiérrez J (Editor). Tesis de doctorado. Universidad de Colima. Tecomán, Colima, México. Pp. 12.
- Caicedo VAM y Bellotti AC (1996) Biogeography. En *Entomopathogenic nematology*. R Gaugler (Editor) CABI Publishing. Department of Entomology, Rutgers University, New Brunswick, New Jersey, USA. Pp. 115 – 143.
- Campos-Herrera R, Escuer M, Labrador S, Robertson L, Barrios L y Gutiérrez C (2007) Distribution of the entomopathogenic nematodes from La Rioja (Northern Spain). *Journal of Invertebrate Pathology*, 95: 125 – 139.
- CONABIO - Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Especies Exóticas (2007) [http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/exoticas/doctos/presentacion .html](http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/exoticas/doctos/presentacion.html). Último acceso 27 de Noviembre de 2008.
- Curran J y Heng J (1992) Comparison of three methods for estimating the number of entomopathogenic nematodes present in soil samples. *Journal of Nematology*, 24: 170 – 176.
- Dillon A, Downes M y Griffin C (2000) Biogeography. En *Entomopathogenic nematology*. R Gaugler (Editor) CABI Publishing. Department of Entomology, Rutgers University, New Brunswick, New Jersey, USA. Pp. 115 – 143.
- Doucet ME y De Doucet MMA (1997) Biogeography. En *Entomopathogenic nematology*. R Gaugler (Editor) CABI Publishing. Department of Entomology, Rutgers University, New Brunswick, New Jersey, USA. Pp. 115 – 143.
- FAO - Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (2003) Capítulo 2. La agricultura orgánica y el medio ambiente. En *Agricultura orgánica, ambiente y seguridad alimentaria*. El-Hage Scialabba N, Hattam C (Editores).



<http://www.fao.org/DOCREP/005/Y4137S/y4137s04.htm#fn15>. Último acceso 27 de Noviembre de 2008.

FAO - Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (2007) Parte II. Examen mundial y regional: una perspectiva a más largo plazo. En *El estado Mundial de la Agricultura y la Alimentación*. ISSN 0251-137.1. Pp. 134 – 148.

Fisher P y Führer E (1990) Introduction. En *Habitat preference for entomopathogenic nematodes, their insect host and new faunistic records for the Czech Republic*. Mracek Z, Becvar S, Kindlmann P, Jersáková J (Editores). *Biological Control*, 34: 27 – 37.

Foley JA, DeFries R, Asner GP, Barford C, Bonan G, Carpenter SR, Chapin FS, Coe MT, Daily GC, Gibbs HK, Helkowski JH, Holloway T, Howard EA, Kucharik CJ, Monfreda C, Patz JA, Prentice IC, Ramankutty N y Snyder PK (2005) Parte I. Servicios ambientales y agricultura. En *El estado Mundial de la Agricultura y la Alimentación*. FAO. ISSN 0251-137.1. Pp. 13 – 14.

García-del Pino F (1994) Los nemátodos entomopatógenos (Rhabditida: Steinernematidae y Heterorhabditidae) presentes en Cataluña y su utilización para el control biológico de insectos. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona. Cataluña, España.

Gasser RB (2001) Capítulo 4. Identification of parasitic nematodes and study of genetic variability using PCR approaches. En *Parasitic nematodes; molecular biology, biochemistry and immunology*. Kennedy MW, Harnett W (Editores). CABI Publishing, New York, USA. Pp. 53 – 82.

Gaugler R (1988) Entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae y Heterorhabditidae) En *Biological Control: A guide to natural enemies in North America*. Weeden CR, Shelton AM, Hoffmann MP (Editores). Cornell University. USA. <http://www.nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol/pathogens/nematodes.html>. Último acceso 27 de Noviembre de 2008.

Gaugler R (2002) *Entomopathogenic Nematology*. CABI Publishing, UK. Pp. 4.

Giayetto AL y Cichón LI (2006) Distribución, gama de huéspedes y especificidad de cinco poblaciones de *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda: Heterorhabditidae) del alto valle de Río Negro y Neuquén, Argentina. *RIA*, 35: 163 – 183.



- Glazer I (2002) Survival Biology. En *Entomopathogenic nematology*. R Gaugler (Editor) CABI Publishing. Department of Entomology, Rutgers University, New Brunswick, New Jersey, USA. Pp. 169 – 187.
- Grewal PS (1999) Production, formulation y quality. En *Optimal use of insecticidal nematodes in pest management*. Polavarapu S (Editor). Blueberry Cranberry Research and Extension Center Rutgers University, USA. Pp. 15 – 24.
- Grewal PS (2000) Enhanced ambient storage stability of an entomopathogenic nematode through anhydrobiosis. *Pest Management Science*, 56: 401 – 406.
- Grewal PS (2002) Formulation and Application Technology. En *Entomopathogenic nematology*. R Gaugler (Editor) CABI Publishing. Department of Entomology, Rutgers University, New Brunswick, New Jersey, USA. Pp. 115 – 143.
- Grewal PS., De Nardo EAB., y Aguilera MM. (2001). Entomopathogenic Nematodes: Potential For Exploration and Use in South America. *Neotropical Entomology*, 30: 191 – 205.
- Griffin CT, Chaerani R, Fallon D, Reid AP y Downes MJ (2000) Occurrence and distribution of the entomopathogenic nematodes *Steinernema* spp. and *Heterorhabditis indica* in Indonesia. *Journal of Helminthology*, 74: 143 – 150.
- Hara HA, Gaugler R, Kaya HK y Lebeck LM (1991) Biogeography. En *Entomopathogenic nematology*. R Gaugler (Editor) CABI Publishing. Department of Entomology, Rutgers University, New Brunswick, New Jersey, USA. Pp. 115 – 143.
- Hazir S, Keskin N, Stock SP, Kaya HK y Özcan S (2003) Diversity and distribution of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Turkey. *Biodiversity and Conservation*, 12: 375 – 386.
- Hominick WM (2002) Biogeography. En *Entomopathogenic nematology*. R Gaugler (Editor) CABI Publishing. Department of Entomology, Rutgers University, New Brunswick, New Jersey, USA. Pp. 115 – 143.
- Hominick WM, Reid AP, Bohan DA, Briscoe BR (1996) Biogeography. En *Entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for biological control of soil pests*. Hazir S, Kaya HK, Stock SP, Keskin N (Editores). *Turkish Journal of Biology*, 27: 181 – 202.



- Hominick WR, Briscoe BR, del Pino FG, Heng J, Hunt DJ, Kozodoy E, Mracek Z, Nguyen KB, Reid AP, Spiridonov S, Stock P, Sturhan D, Waturu C, Yoshida M (1997) Biosystematics of entomopathogenic nematodes: current status, protocols and definitions. *Journal of Helminthology*, 71: 271 – 298.
- Islas-López MA, Sanjuan-Galindo R, Rodríguez-Hernández AI, Chavarría- Hernández N (2005) Monoxenic production of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* using cultura media containing agave juice (aguamiel) from Mexican maguey-pulquero (*Agave* spp.). Effects of the contents of nitrogen, carbohydrates and fat on infective juvenile production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68: 91 – 97.
- Ivanova ES y Spiridonov SE (2003) First report of *Steinernema bicornutum* (Nematoda, Rhabditida, Steinernematidae) from the north Caucasus. *Vestnik Zoologii*, 37: 57 – 63.
- Kaya HK (1987) A parasitic nematodes in biological control of insect pests. Cooperative Extension University of California. Division of Agriculture and Natural Resources Formerly Leaflet 21340.
- Kaya HK y Gaugler R (1993) Citado por Stock SP (2002) *New trends in entomopathogenic nematode systematics: impact of molecular biology and phylogenetic reconstruction*. MEDIMOND Inc, Department of Plant Pathology, University of Arizona, Tucson, Arizona, USA. Pp. 1 – 2.
- Kaya HK y Stock P (1997) Techniques in insect nematology. En *Manual of Techniques in insect pathology*. Lawrence Lacey (Editor). Biological techniques series. Academic Press. Pp. 281 – 324.
- Kaya HK, Aguilera MM, Alumai A, Choo HY, De la Torre-Martínez Ma.M, Fodor A, Ganguly S, Hazir S, Lakatos T, Pye A, Wilson M, Yamanaka S, Yang H y Ehlers RU (2006) Status of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria from selected countries or regions of the world. *Biological Control*, 38: 134 – 155.
- Kramer I, Hirschy O y Grunder JM (2000) Biogeography. En *Entomopathogenic nematology*. R Gaugler (Editor) CABI Publishing. Department of Entomology, Rutgers University, New Brunswick, New Jersey, USA. Pp. 115 – 143.



- Kung SP, Gaugler R y Kaya HK (1990) Influence of soil pH and oxygen on persistence of *Steinernema* spp. *Journal of Nematology*, 22: 440 – 445.
- Liu J y Berry DE (1995) Determination of PCR conditions for RAPD analysis in entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae and Steinernematidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 65: 79 – 81.
- Lozano-Gutiérrez J (2001) El estrés calórico en la expresión de las proteínas HSP70 y HSP90 en nemátodos entomopatógenos (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae). Tesis de doctorado. Universidad de Colima. Tecomán, Colima, México.
- Molina-Ochoa J, Lezama-Gutiérrez R, González-Ramírez M, López-Edwards M, Rodríguez-Vega MA y Arceo-Palacios F (2003) Pathogens and parasitic nematodes associated with populations of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in Mexico. *Florida Entomologist*, 86: 244 – 253.
- Mracek Z y Webster JM (1993) Survey of Heterorhabditidae and Steinernematidae (Rhabditida, Nematoda) in western Canada. *Journal of Nematology*, 25: 710 – 717.
- Nguyen KB y Adams BJ (2003) SEM and systematic studies of *Steinernema abbasi* Elawad et al., 1997, and *S. riobrave* Cabanillas et al., 1994 (Rhabditida: Steinernematidae). *Zootaxa*, 179: 1 – 10.
- Nguyen KB y Duncan LW (2002) *Steinernema diaprepesi* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a parasite of the citrus root weevil *Diaprepes abbreviatus* (L) (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Nematology*, 34: 159 – 170.
- Nguyen KB y Smart GC Jr (1993) Scanning electron microscope studies of *Steinernema anomali* Kozodoi. *Journal of Nematology*, 25: 486 – 492.
- Nguyen KB y Smart GC Jr (1994) *Neosteinernema longicurvicauda* n. gen., n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a parasite of the termite *Reticulitermes flavipes* (Koller). *Journal of Nematology*, 26: 162 – 174.
- Nguyen KB y Smart GC Jr (1995) Morphometrics of infective juveniles of *Steinernema* spp. and *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda: Rhabditida). *Journal of Nematology*, 27: 206 – 212.



- Nguyen KB y Smart GC Jr (1996) Identification of entomopathogenic nematodes in the Steinernematidae and Heterorhabditidae (Nematoda: Rhabditida). *Journal of Nematology*, 28: 286 – 300.
- Nguyen KB, Puza V y Mracek Z (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: 251 – 264.
- Nguyen KB, Mracek Z y Webster JM (2006) Morphological and molecular characterization of a new isolate of *Steinernema feltiae* (Filipjev, 1934) from Vancouver, Canada, with morphometrical comparison with the topotype population from Russia. *Zootaxa*, 1132: 51 – 61.
- Nguyen KB, Tesfamariam M, Gozel U, Gaugler R y Adams BJ (2004) *Steinernema yirgalemense* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae) from Ethiopia. *Nematology*, 6: 839 – 856.
- Nguyen KB, Maruniak J y Adams BJ (2001) The diagnostic and phylogenetic utility of the rDNA internal transcribed spacer sequences of *Steinernema*. *Journal of Nematology*, 33: 73 – 82.
- Ortega-Morales E (2008) Efecto de las condiciones de operación sobre la producción del nematodo entomopatógeno *Steinernema carpocapsae* en biorreactor agitado mecánicamente. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Tulancingo, Hidalgo, México.
- Pamjav H, Triga D, Buzás Z, Vellai T, Lucskai Attila, Adams B, Reid AP, Burnell A, Griffin C, Glazer I, Klein MG y Fodor A (1999) Novel application of PhastSystem polyacrylamide gel electrophoresis using restriction fragment length polymorphism – internal transcribed spacer patterns of individuals for molecular identification of entomopathogenic nematodes. *Electrophoresis*, 20: 1266 – 1273.
- Phan LK, Takemoto S y Futai K (2006) *Steinernema ashiuense* sp. n. (Nematoda: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Japan. *Nematology*, 8: 681 – 680.
- Poinar GO Jr (1967) Results and discussion. En *Steinernema carpocapsae* (Weiser, 1955) (Nematoda: Rhabditida) – *new species for entomopathogenic fauna of Bulgaria*. Shishiniova M, Budurova L, Gradinarov D (Editores) *Experimental Pathology and Parasitology*, 1: 30 – 35.



- Poinar GO Jr (1990) Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterhabditidae. En *Entomopathogenic nematodes in biological control*. R Gaugler, HK Kaya (Editores) CRC Press. Boca Ratón, Florida, USA. Pp. 23 – 61.
- Poinar GO Jr (1993) Citado por Stock SP (2002) *New trends in entomopathogenic nematode systematics: impact of molecular biology and phylogenetic reconstruction*. MEDIMOND Inc, Department of Plant Pathology, University of Arizona, Tucson, Arizona, USA. Pp. 1 – 2.
- Qiu L, Fang Y, Zhou Y, Pang Y y Nguyen KB (2004) *Steinernema guangdongense* sp. n. (Nematoda: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from southern China with a note on *S. serratum* (*nomen nudum*). *Zootaxa*, 704: 1 – 20.
- Reyes-Hernández MA (2003) Patogenicidad de nemátodos entomopatógenos (Nematoda: Steinernematidae, Heterirhabditidae) en larvas y pupas de mosca de la fruta *Anastrepha ludens* Loew (Diptera: Tephritidae). Tesis de maestría. Universidad de Colima. Tecomán, Colima, México.
- Rodríguez M (2001) Citado por Gómez L, Campos R, Sánchez L, Rodríguez MG (2004) *Método rápido de preparación de nematodos entomopatógenos para la observación en microscopio óptico*. (Editores). *Protección Vegetal*, 19: 67 – 68.
- Rosa JS, Bonifassi E, Amaral J, Lacey LA, Simoes N y Laumond C (2000) Natural occurrence of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: *Steinernema*, *Heterorhabditis*) in the Azores. *Journal of Nematology*, 32: 215 – 222.
- Rosales ALC y Suárez HZ (1998) Biogeography. En *Entomopathogenic nematology*. R Gaugler (Editor) CABI Publishing. Department of Entomology, Rutgers University, New Brunswick, New Jersey, USA. Pp. 115 – 143.
- SAGARPA - Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (2007) Capítulo 1. Diagnóstico del sector agropecuario y pesquero. En *Programa Sectorial de Desarrollo Agropecuario y Pesquero 2007-2012*. ISBN 978- 968- 800- 730- 3. Pp. 11 – 14.
- Sansour MA y Iraki NM (2000) Biogeography. En *Entomopathogenic nematology*. R Gaugler (Editor) CABI Publishing. Department of Entomology, Rutgers University, New Brunswick, New Jersey, USA. Pp. 115 – 143.



- Salas-Luévano MA (2002) Distribución natural de nemátodos entomopatógenos (Nematoda: Steinernematidae y Heterorhabditidae) en sistemas agroecológicos de Zacatecas. Tesis de Doctorado. Universidad de Colima. Tecomán, Colima, México.
- Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T (1989) Sesión no. 5. Electroforesis en Gel de Agarosa. En *Análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en muestras de alimentos*. Somma M, Querci M (Editores). European Commission, Directorate-General Joint Research Centre. Organización Mundial de la Salud, Oficina Regional para Europa. Pp 1 – 12.
- Shapiro-Ilan DI y Gaugler R (2002) Production technology for entomopathogenic nematodes and their bacterial symbionts. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 28: 137 – 146.
- Shishiniova M, Budurova L y Gradinarov D (1998) *Steinernema carpocapsae* (Weiser, 1955) (Nematoda: Rhabditida) – new species for entomopathogenic fauna of Bulgaria. *Experimental Pathology and Parasitology*, 1: 30 – 35.
- SIAP – Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Avance de siembras y cosechas; riego + temporal (2008) http://reportes.siap.gob.mx/Agricola_siap/FichaPorEstado.do. Último acceso 27 de Noviembre de 2008.
- Spiridonov SE, Moens M y Wilson MJ (2007) Fine scale spatial distributions of two entomopathogenic nematodes in a grassland soil. *Applied Soil Ecology*, 37: 192 – 201.
- Steiner G (1923) Capítulo 5. Estudio taxonómico de los nemátodos entomopatógenos. En *Los nemátodos entomopatógenos* (Rhabditida: Steinernematidae y Heterorhabditidae) presentes en Cataluña y su utilización para el control biológico de insectos. García-del Pino F (Editor). Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona. Cataluña, España. Pp. 132 – 161.
- Steiner WA (1996) Citado por Mracek Z, Becvar S, Kindlmann P, Jersáková J (2005) *Habitat preference for entomopathogenic nematodes, their insect host and new faunistic records for the Czech Republic*. *Biological Control*, 34: 27 – 37.
- Stevenson LA, Gasser RB y Chilton NB (1996) Capítulo 4. Identification of parasitic nematodes and study of genetic variability using PCR approaches. En *Parasitic nematodes; molecular biology, biochemistry and immunology*. Kennedy MW, Harnett W (Editores). CABI Publishing, New York, USA. Pp. 53 – 82.



- Stock SP (1992) Las plagas agrícolas: Alternativas para su control. Anales de la Sociedad Rural Argentina, 13/14, 74 – 79.
- Stock SP (1995) Natural populations of entomopathogenic nematodes in the pampean region of Argentina. Nematologica, 25: 143 – 148.
- Stock SP y Gress JC (2006) Diversity and phylogenetic relationships of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) from the Sky Islands of southern Arizona. Journal of Invertebrate Pathology, 92: 66 – 72.
- Stock SP y Hunt DJ (2005) Parte I. Nematode morphology and taxonomy: morphology and systematics of nematodes used in biocontrol. En *Nematodes as Biocontrol Agents*. Grewal PS, Ehlers RU, Shapiro-Ilan DI (Editores). CABI Publishing, USA. Pp. 3 – 40.
- Stock SP, Somsook V y Reid AP (1998) *Steinernema siamkayai* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), an entomopathogenic nematode from Thailly. Systematic Parasitology, 41: 105 – 113.
- Sturhan D y Mracek Z (2000) Comparison of the *Galleria* baiting technique and a direct extraction method for recovering *Steinernema* (Nematoda: Rhabditida) infective stage juveniles from soil. Folia Parasitologica, 47: 315 – 318.
- Szalanski AL, Taylor DB, Mullin PG (2000) Assessing nuclear and mitochondrial DNA sequence variation within *Steinernema* (Rhabditida: Steinernematidae). Journal of Nematology, 32: 229 – 233.
- Tilman D, Cassman KG, Matson PA, Naylor R y Polasky S (2002) Parte I. Servicios ambientales y agricultura. En *El estado Mundial de la Agricultura y la Alimentación*. FAO. ISSN 0251-137.1. Pp. 13 – 14.
- Torres-Sánchez E, Cárdenas-Cota HM y De la Torre-Martínez Ma.M (2004) Sección II. Biocontrol de plagas agrícolas y enfermedades de las plantas. En *Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna*. Bolívar-Zapata FG (Editor). El colegio nacional, México. Pp. 505 – 526.
- Travassos L (1927) Capítulo 5. Estudio taxonómico de los nemátodos entomopatógenos. En *Los nemátodos entomopatógenos* (Rhabditida: Steinernematidae y Heterorhabditidae) presentes



en Cataluña y su utilización para el control biológico de insectos. García-del Pino F (Editor). Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona. Cataluña, España. Pp. 132 – 161.

Waturu CN (1998) Biogeography. En *Entomopathogenic nematology*. R Gaugler (Editor) CABI Publishing. Department of Entomology, Rutgers University, New Brunswick, New Jersey, USA. Pp. 115 – 143.

Weiser J (1955) Results and discussion. En *Steinernema carpocapsae* (Weiser, 1955) (Nematoda: Rhabditida) – *new species for entomopathogenic fauna of Bulgaria*. Shishiniova M, Budurova L, Gradinarov D (Editores) *Experimental Pathology and Parasitology*, 1: 30 – 35.

Westermeier R (1997) Sesión no. 5. Electroforesis en Gel de Agarosa. En *Análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en muestras de alimentos*. Somma M, Querci M (Editores). European Commission, Directorate-General Joint Research Centre. Organización Mundial de la Salud, Oficina Regional para Europa. Pp. 1 – 12.

White GF. (1927). A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science*, 66: 302 – 303.

Woodring JL, Kaya HK (1988) Steinernematid and Heterorhabditid Nematodes: a handbook of techniques. South Coop. Ser Bull. Arkansas Agric. Experimental Station. Fayetteville.

Wright DJ y Perry RN (2002) Physiology and Biochemistry. En *Entomopathogenic nematology*. R Gaugler (Editor) CABI Publishing. Department of Entomology, Rutgers University, New Brunswick, New Jersey, USA. Pp. 145 – 168.