



Facultad de Ciencias Biológicas  
BUAP

**BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE PUEBLA**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS**

**Aislamiento e identificación de Nemátodos  
Entomopatógenos en suelos de cultivos de importancia económica en  
el municipio de Ayala, Morelos, México.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**LICENCIADO EN BIOLOGIA**

**PRESENTA:**

**MIGUEL ANGEL DOMINGUEZ NAVA**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**JOSE LINO ZUMAQUERO RIOS**

**Puebla, México, junio de 2022**

# INDICE

<b>INDICE</b> .....	<b>2</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>4</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>5</b>
<b>1 INTRODUCCION</b> .....	<b>6</b>
<b>3 ANTECEDENTES</b> .....	<b>9</b>
<b>3.1 NEMÁTODOS</b> .....	<b>9</b>
<b>3.2 CICLO DE VIDA DE NEMÁTODOS ENTOMOPATÓGENOS</b> .....	<b>12</b>
<b>3.3 FACTORES FÍSICOQUÍMICOS DEL SUELO</b> .....	<b>14</b>
<b>3.4 FACTORES CLIMÁTICOS Y ESTACIONALES</b> .....	<b>14</b>
<b>3.5 COMPATIBILIDAD CON INSECTICIDAS QUÍMICOS</b> .....	<b>15</b>
<b>3.6 ESPECIES AISLADAS EN MÉXICO</b> .....	<b>15</b>
<b>3.7 VENTAJAS Y DESVENTAJAS EN COMPARACIÓN CON INSECTICIDAS QUÍMICOS</b> .....	<b>18</b>
<b>3.8 CEPAS APLICADAS EN ALGUNAS DE LAS PLAGAS MÁS COMUNES EN MÉXICO Y FACILIDAD DE ADQUISICIÓN</b> .....	<b>21</b>
<b>4 JUSTIFICACION</b> .....	<b>23</b>
<b>5 HIPOTESIS</b> .....	<b>23</b>
<b>6 OBJETIVOS</b> .....	<b>24</b>
<b>6.1 OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>24</b>
<b>6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>24</b>
<b>6.3 MATERIAL BIOLÓGICO</b> .....	<b>24</b>
<b>6.4 MUESTREO DEL SUELO</b> .....	<b>25</b>
<b>6.5 AISLAMIENTO DE NEMÁTODOS DEL SUELO</b> .....	<b>27</b>
<b>6.6 RECUPERACIÓN DE LOS NEMÁTODOS DE LOS CADÁVERES INFECTADOS</b> .....	<b>28</b>
<b>6.7 FIJACIÓN DE LOS NEMÁTODOS</b> .....	<b>28</b>
<b>6.8 IDENTIFICACIÓN Y DESCRIPCIÓN DE LOS NEMÁTODOS</b> .....	<b>29</b>
<b>6.9 PROCESAMIENTO PARA UNA PREPARACIÓN DE PORTAOBJETOS</b> .....	<b>29</b>
<b>6.10 DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DEL SUELO</b> .....	<b>30</b>
<b>7 RESULTADOS</b> .....	<b>33</b>
<b>7.1 MUESTREO Y AISLAMIENTO DE LOS NEMÁTODOS ENTOMOPATÓGENOS</b> .....	<b>33</b>

7.2	ANÁLISIS DE SUELO.....	33
7.3	IDENTIFICACIÓN Y DESCRIPCIÓN DE LOS NEMÁTODOS .....	34
7.3.1	Nemátodo especie 1 (juvenil).....	34
7.3.2	Nemátodo especie 2 (Hembra).....	34
7.3.3	Nemátodo especie 3.....	34
8	DISCUSION .....	38
8.1	DIAGNOSIS .....	38
8.2	FACTORES FÍSICOQUÍMICOS DEL SUELO.....	39
8.3	DISTRIBUCIÓN DE LAS FAMILIAS HETERORHABDITIDAE Y STEINERNEMATIDAE .....	41
9.	CONCLUSIÓN.....	43

## RESUMEN

Los insecticidas químicos han sido los principales controladores de plagas por mucho tiempo, sin embargo, sus efectos nocivos para la salud y el medio ambiente han provocado el desarrollo de productos amigables con el planeta como los nemátodos entomopatógenos. Son varias las familias capaces de controlar plagas, pero las más estudiadas son Heterorhabditidae y Steinernematidae. En este trabajo se aislaron nemátodos de suelos de cultivos de importancia económica en las localidades de Moyotepec y el Chivatero en el municipio de Ayala, Morelos, México. Se analizaron las características fisicoquímicas del suelo. Se utilizó la técnica de cebo y Willis Molloy para la recuperación de nemátodos. Solo se aislaron nemátodos directamente del suelo mediante la técnica de Willis Molloy. De manera general los suelos se clasificaron en Francos arcillosos y Francos arenosos, presentaron un pH neutro (7.0-7.5) y una materia orgánica con variaciones de un mínimo de 1.73 hasta un máximo de 3.26 %. Solo se aislaron nemátodos directamente del suelo mediante la técnica de Willis Molloy. Los nemátodos se identificaron morfológicamente y se distinguieron tres especies, dos dentro de la familia Heteroderidae y 1 juvenil que no pudo ser identificado. A falta de identificar el juvenil no se encontraron nemátodos entomopatógenos. Las condiciones de pandemia dificultaron la realización de este estudio por lo que se pretende continuar la identificación de especies en posteriores trabajos.

## **ABSTRACT**

Chemical insecticides have been the main pest controllers for a long time; however, their harmful effects on health and the environment have led to the development of environmentally friendly products such as entomopathogenic nematodes. There are several families capable of controlling pests, but the most studied are Heterorhabditidae and Steinernematidae. In this work, nematodes were isolated from soils of economically important crops in the localities of Moyotepec and El Chivatero in the municipality of Ayala, Morelos, Mexico. The physicochemical characteristics of the soil were analyzed. The bait and Willis Molloy technique was used to recover nematodes. Only nematodes were isolated directly from the soil using the Willis Molloy technique. In general, the soils were classified as loamy clay loam and sandy loam, with a neutral pH (7.0-7.5) and organic matter varying from a minimum of 1.73 to a maximum of 3.26 %. Only nematodes were isolated directly from the soil using the Willis Molloy technique. The nematodes were identified morphologically and three species were distinguished, two within the family Heteroderidae and one juvenile that could not be identified. In the absence of identifying the juvenile, no entomopathogenic nematodes were found. The pandemic conditions made it difficult to carry out this study, so it is intended to continue the identification of species in subsequent works.

# 1 INTRODUCCION

En la última década el crecimiento poblacional ha sido tan exponencial que los gobiernos mundiales han destinado millones de hectáreas de selvas y bosques para la producción de alimentos. De acuerdo a datos de INEGI tan solo en 2019, en México los cultivos anuales de frutas y hortalizas ocuparon 12,6 millones de hectáreas y 2,5 millones para cultivos perennes.

Uno de los principales problemas que enfrenta la agricultura son las plagas de insectos que generan pérdidas de millones de dólares al año. Dentro de las plagas más importantes en México se encuentran el “gusano cogollero”, *Spodoptera frugiperda*, considerada la mayor plaga del maíz (*Zea mays* Vell.); Un gran número de especies pertenecientes a la familia Melolonthidae comúnmente llamadas “gallinas ciegas” que atacan las raíces de diversos tipos de cultivos agrícolas; El picudo del agave *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal; y las “moscas pintas” *Aeneolamia* spp. y *Prosapia* spp. cuyo objetivo principal es la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) (Moscoso y Cortés, 1995; Morón, 2010; Jarillo, 2001; Rodríguez *et al.*, 2012; Peck, 2001). Tan solo en Morelos las “gallinas ciegas” han llegado a ocasionar pérdidas de hasta 57 millones de pesos en un año (Villalobos *et al.* 2001; Núñez-Valdez *et al.* 2002, como se citó en Zaragoza *et al.*, 2016)

Por muchos años los insectos dañinos han sido combatidos principalmente con productos químicos, sin embargo, el uso indiscriminado de insecticidas no solo los ha afectado, pues se tiene ampliamente documentado que también ha afectado de manera directa o indirecta a muchos otros seres vivos, causando la muerte de millones de animales como; aves, mamíferos y artrópodos de gran importancia ecológica (Devine *et al.*, 2008). Tan solo en el año 2017 la producción de plaguicidas en México fue mayor a 106 mil t (Moo-Muñoz *et al.*, 2020).

Este problema ha llevado a los científicos a desarrollar alternativas al uso de pesticidas, dentro de las cuales destaca el control biológico, que se define como el “uso de organismos para controlar poblaciones de otros organismos que se consideran dañinos” (Nicholls, 2008). Dentro de las opciones que tienen la capacidad de ejercer control biológico están los nemátodos entomopatógenos.

Los nemátodos entomopatógenos son parásitos obligados de insectos que se encuentran en los suelos de todo el mundo. Las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae son las más estudiadas dentro de este grupo. Tienen una simbiosis con bacterias del género *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* que son las que en realidad matan al huésped (Delgado *et al.*, 2014). El nematodo transporta la bacteria en el intestino durante la fase infecciosa juvenil (JI), que penetra en el insecto y regurgita los simbiositos en la hemolinfa; estas bacterias matan al insecto en un lapso de 24 a 48 h (Cich *et al.*, 2008).

El empleo de nemátodos entomopatógenos ha aumentado tanto su popularidad que en países con alto desarrollo tecnológico como Estados Unidos, Inglaterra, Alemania, Canadá, India y todo Reino Unido son producidos de manera comercial, en contraste con países como México donde es muy difícil comprarlos (Vashisth, Chandel & Sharma, 2013). La gran mayoría de las especies disponibles en el mercado usadas en México provienen de EE. UU. (Delgado *et al.*, 2014). Especies como: *Heterorhabditis bacteriophora*, *Heterorhabditis indica* y *Steinernema carpocapsae* son muy utilizadas en investigaciones, aunque hay casos en los que son cepas adquiridas y no nativas. La introducción de especies “exóticas” podría afectar la distribución natural de especies nativas, ya que las especies introducidas podrían desplazar a especies locales (Nicholls, 2008). A pesar de su importancia, se han hecho muy pocos trabajos de aislamiento e identificación de especies en Morelos.

Identificar especies nativas, nos permite ampliar el número de posibles alternativas como agentes de control biológico, además la cercanía a los insectos nativos

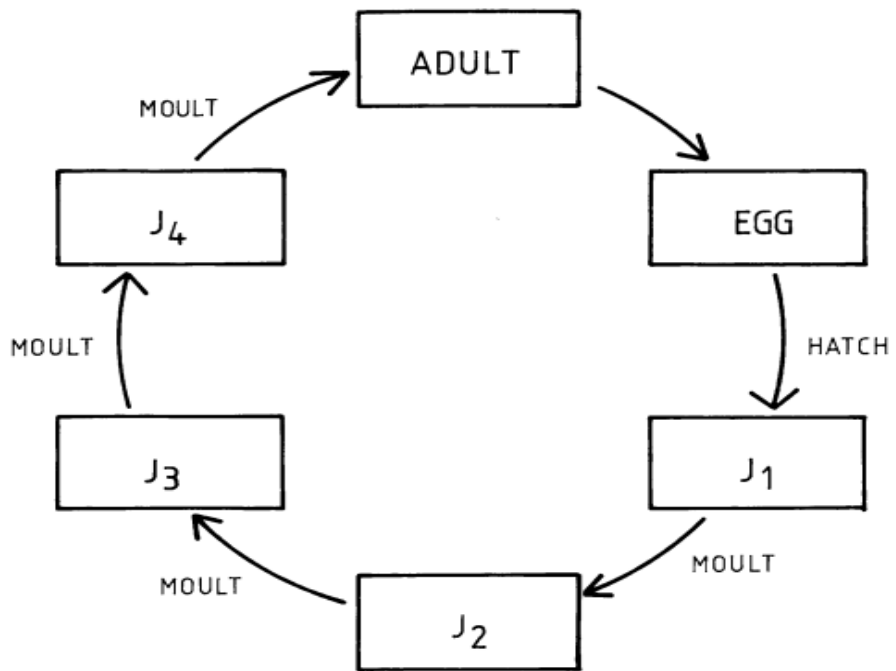
podría hacerlas más efectivas y económicas que especies exóticas. En el presente trabajo se indagará el aislamiento e identificación de especies nativas de nemátodos entomopatógenos de suelos de cultivos de importancia económica en el municipio de Ayala, Morelos.

### 3 ANTECEDENTES

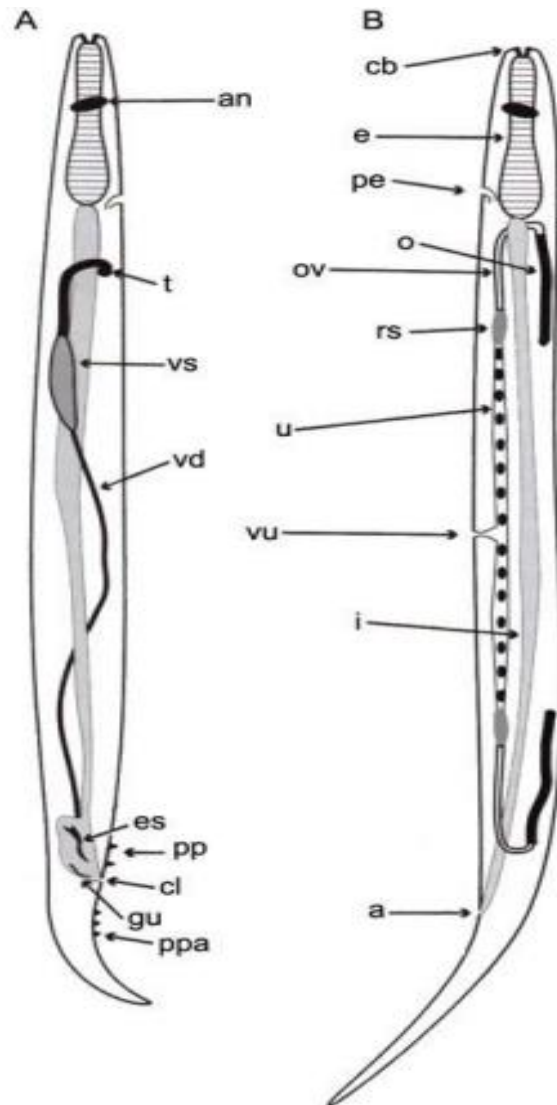
#### 3.1 Nemátodos

De acuerdo con la literatura los nemátodos se dividen en 3 clases, 31 órdenes, 267 familias, 2829 géneros y 24.783 especies (Hodda, 2011). Se distribuyen prácticamente por todas las regiones geográficas del planeta y se pueden encontrar especies en vida libre o parasitas de animales y plantas (Navone *et al.*, 2017).

El cuerpo de un nemátodo típico consiste en un cilindro flexible que se estrecha en ambos extremos y que termina en punta roma. Presentan simetría bilateral, aunque tienen elementos de simetría radial alrededor de la boca. El cuerpo está rodeado por una flexible pero dura cutícula de colágeno. Son animales triploblásticos ya que cuentan con tres capas de células (ectodermo, mesodermo y endodermo). Los órganos del sistema reproductivo, nervioso, digestivo están desarrollados, son tubulares y se mantienen libres entre la cavidad del cuerpo, el pseudocoel. La mayoría de las especies tienen sexos separados, aunque hay especies hermafroditas, los machos son más pequeños que las hembras y muchas especies tienen estructuras copulatorias (Bursa copulatória y espículas). El ciclo de vida de los nematodos consta de seis etapas o estadios: el huevo (o embrión), cuatro estadios juveniles (1, 2, 3, 4) y el adulto (Figura 1). Las juveniles se dividen en filariformes y rhabditiformes. Los filariformes son la forma infectiva, son largas y están diseñadas para la penetración. Se les llama rhabditiformes a los juveniles que recién eclosionan. Están caracterizados por la presencia de un cuerpo corto y un esófago rhabditiforme. (Wharton, 1986; Bongers & Esquivel, 2011; Fimbres & Flores, 2016; Silva, 2018).



**Figura 1.** El patrón básico del ciclo de vida de los nematodos. El embrión se convierte en un juvenil de primera etapa dentro del huevo, eclosiona y pasa por cuatro mudas antes de convertirse en un adulto sexualmente maduro. (Tomado de Wharton, 1986).



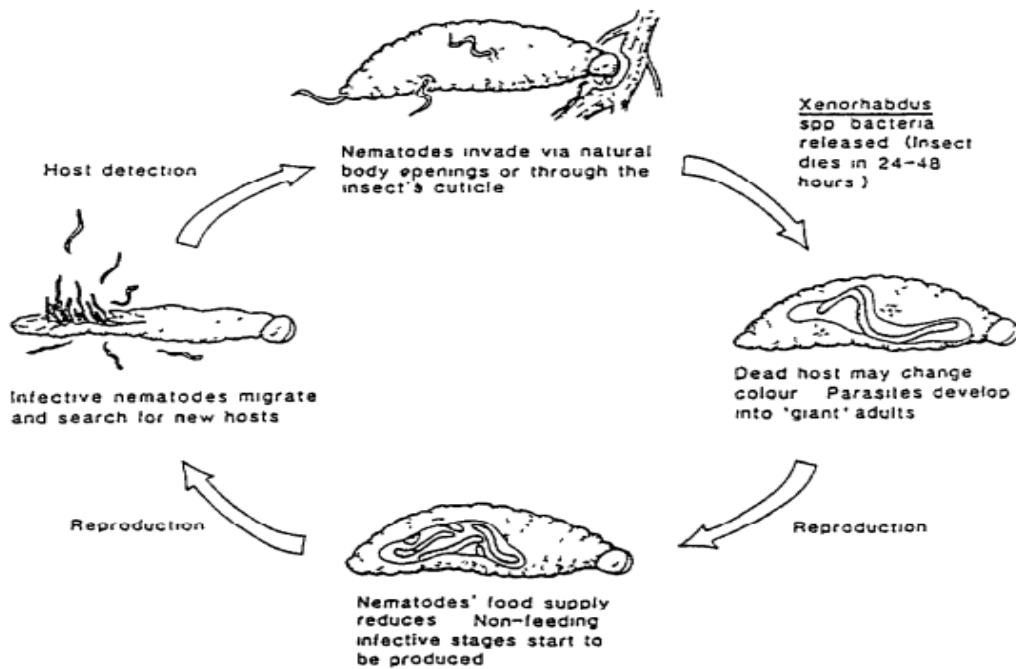
**Figura 2.** Esquema de la morfología general de un nemátodo macho (A) y de una hembra (B). Abreviaturas: a, ano; an, anillo nervioso; cb, cavidad bucal; cl, cloaca; e, esófago; es, espícula; gu, gubernáculo; i, intestino; o, ovario; ov, oviducto; pe, poro excretor; pp, papila preanal; ppa, papila postanal; rs, receptáculo seminal; t, testículo; u, útero; vd, vaso deferente; vs, vesícula seminal; vu, vulva. (Tomado de Navone *et al.*, 2017)

Hay una gran cantidad de nemátodos con la capacidad de parasitar, son 19 las familias que tienen la capacidad de matar, esterilizar o alterar el desarrollo del hospedero (Soto & Santamarina, 1996). Actualmente se considera que son ocho las familias de nemátodos capaces de ejercer control biológico de insectos, estas son: Tetradonematidae, Mermithidae, Allantonematidae, Neotylenchidae, Sphaerularidae, Aphelenchidae, Heterorhabditidae y Steinernematidae, siendo las dos últimas las más estudiadas y usadas como agentes de control biológico (De Ley & Blaxter, 2002, como se citó en Perez, 2019). Actualmente se han descrito alrededor de 100 especies del género *Steinernema* y 16 especies del género *Heterorhabditis* las cuales se encuentran distribuidas prácticamente por todos los continentes del mundo a excepción de la Antártida (Bhat, Chaubey & Askary, 2020)

### **3.2 Ciclo de vida de nemátodos entomopatógenos**

El ciclo de vida de los nemátodos entomopatógenos consta del huevo, cuatro estados juveniles y el adulto (Merino & France, 2009). Se les llaman juveniles infectivos (JI) a la etapa en la que viven en el suelo y en la que infectan a sus presas, además son capaces de infectar a la mayoría de los órdenes y familias de insectos (Klein 1990). Esta etapa (JI), es la única infectiva y de vida libre de su ciclo, están adaptados para sobrevivir varios meses en el suelo sin alimentarse, hasta encontrar algún hospedador (García *et al.*, 2013). Una vez dentro del insecto los nemátodos liberan sus bacterias simbiotes en el hemocele, estas se reproducen y liberan toxinas causando septicemia y la muerte del hospedador en un plazo de 24 a 29 horas (Figura 3) (Kaya & Gaugler 1993). Las bacterias del género *Xenorhabdus* se encuentran en nemátodos del género *Steinernema* y las del género *Photorhabdus* en *Heterorhabditis* (Kaya & Gaugler 1993). Cuando las nuevas generaciones de nemátodos maduran y se convierten en JI, salen en búsqueda de un nuevo huésped una vez que se han terminado los nutrientes en el

hemocele. (Stock, 2015). El tiempo del ciclo de vida desde la infección hasta la salida de los juveniles es 7 a 10 días en *Steinernema* y de 12 a 15 días en *Heterorhabditis* (Soler et al., 2003).



**Figura 3.** Ciclo de vida de nemátodos entomopatógenos. (Tomado de Grewal & Georgis, 1999).

La principal diferencia entre las familias Heterorhabditidae y Steinernematidae consiste en que todas las especies de la familia Steinernematidae son sexuales, mientras que en Heterorhabditidae son hermafroditas en la primera generación, pero, sexuales en la segunda (Sáenz, 2005). **Por esta razón** los Steinernematidos requieren de un juvenil infectivo de ambos sexos para invadir un insecto huésped y reproducirse, mientras los Heterorhabditidos solo necesitan de un juvenil infectivo para penetrar un huésped dando lugar a adultos autofecundados (Sáenz, 2000).

### **3.3 Factores fisicoquímicos del suelo**

La fase de juvenil infectivo es la más importante para la sobrevivencia de los nemátodos, al ser la única de vida libre, la hace vulnerable a las condiciones microclimáticas del suelo, por ende, algún cambio en las características fisicoquímicas del suelo puede disminuir su movilidad y sobrevivencia, pues al ser organismos tan pequeños no pueden desplazarse por grandes distancias, evitando así que puedan huir de las condiciones desfavorables.

La presencia de los nemátodos entomopatógenos puede disminuir por las altas temperaturas y la falta de humedad (Almazán, Armendáriz, & Rodríguez, 2004). Se les pueden encontrar en suelos con valores de pH entre 4 y 8, pero a valores mayores de 8 o menores de 4 disminuye la supervivencia (Vashisth, Chandel & Sharma, 2013; Montores, Cortez & Zepeda, 2016). Hay una afinidad de los nemátodos con los suelos de tipo Franco-Arcillo-Arenoso debido a que facilitan su desplazamiento al buscar presas, por otro lado; suelos, del tipo arcilloso; suelos, saturados de agua y suelos con alto contenido de materia orgánica pueden llegar a disminuir su supervivencia, pues mantienen bajos niveles de oxígeno. (Montores, Cortez & Zepeda, 2016; Vashisth, Chandel & Sharma, 2013).

### **3.4 Factores climáticos y estacionales.**

La estacionalidad también puede influir en la presencia de nemátodos entomopatógenos, pues lleva consigo cambios en la temperatura, humedad y afecta los ciclos de vida de los posibles hospedadores. Hay registros de aumento en la abundancia de nemátodos entomopatógenos en primavera, seguido por el verano y por último otoño (Půža & Mráček, 2005; Kary et al., 2009; Río & Cameron, 2000). La abundancia de nemátodos entomopatógenos en primavera y otoño puede estar relacionada con un incremento de las poblaciones de insectos (Campos *et al.*, 2010).

### 3.5 Compatibilidad con insecticidas químicos

La compatibilidad de los nemátodos entomopatógenos con insecticidas químicos ha sido estudiada por mucho tiempo arrojando datos realmente interesantes que han generado debate sobre si es conveniente combinar ambos, pues se ha demostrado que el efecto de los insecticidas puede variar entre especies y poblaciones teniendo como resultado una sinergia entre ambos o afectando la sobrevivencia, reproductividad e infectividad de los nemátodos (Kaya, 1985; Rovesti & Deseö 1990; Sabino *et al.*, 2017; Grewal *et al.* 2001; Özdemir *et al.*, 2020; Ulu, Sadic & Susurluk, 2016; Laznik, Vidrih & Trdan, 2012).

### 3.6 Especies aisladas en México

Se tienen registro de aislamiento de nemátodos entomopatógenos en varios estados de México, pero, debido a que no todos llegan hasta nivel especie solo se hará énfasis en los registros hasta nivel taxonómico de especie y en especies que habitan en el suelo (Cuadro 1; Figura 2).

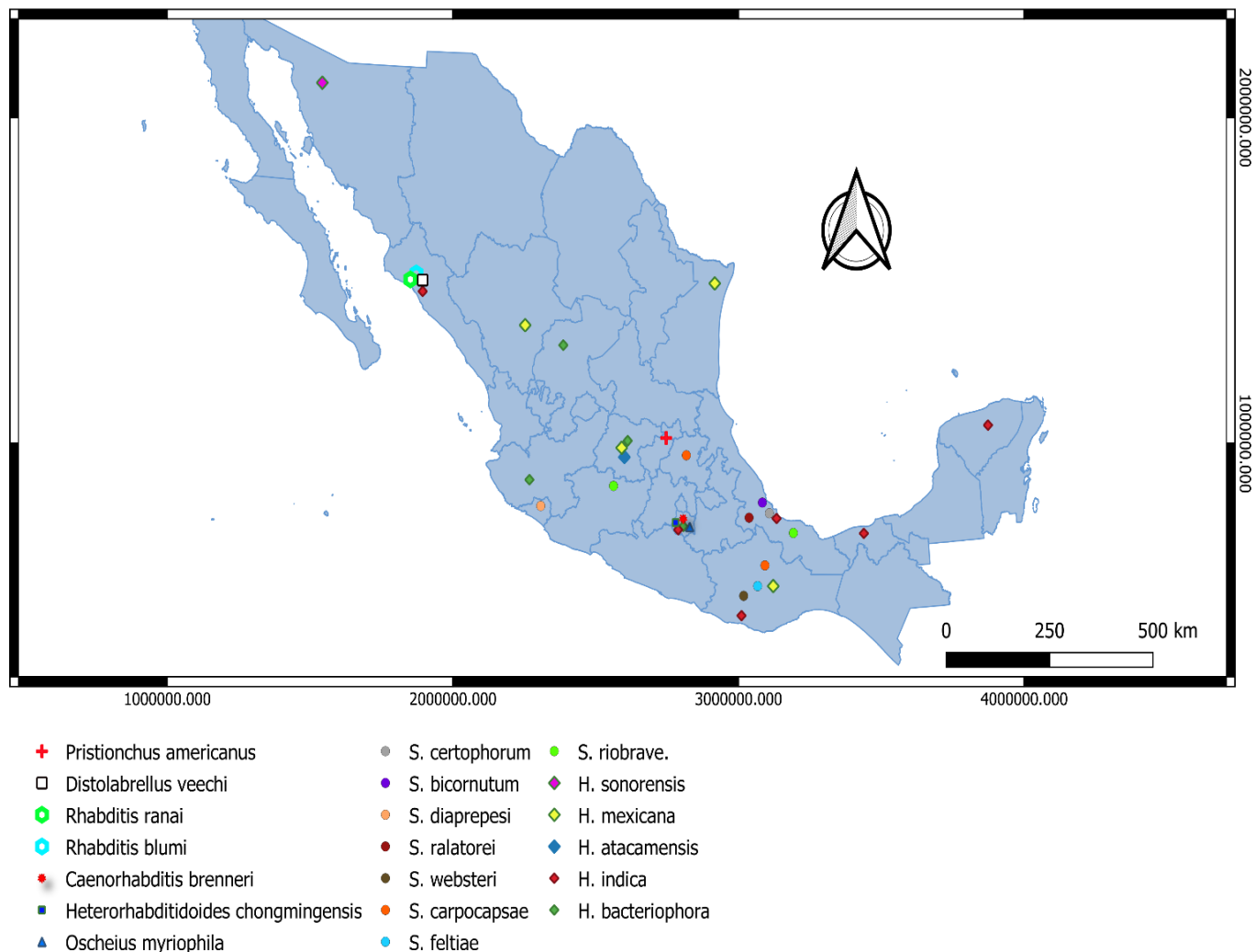
Las especies registradas en el estado de Oaxaca son *Heterorhabditis indica* (Bruno *et al.*, 2020), *H. mexicana* (Girón *et al.*, 2012), *Steinernema feltiae*, (Ruiz *et al.*, 2003; Girón *et al.*, 2012), *S. carpocapsae* (Aquino *et al.*, 2006; Girón *et al.*, 2012) y *S. websteri* (Delgado *et al.*, 2015); en el estado de Veracruz se tienen a *H. indica*, *S. bicornutum* y *S. certophorum* (Grifaldo *et al.*, 2019), *S. riobrave* (Grifaldo-Alcántara, 2011) y *S. ralatorei* (Grifaldo-Alcántara *et al.*, 2017); en Guanajuato están registradas las especies *H. mexicana*, *H. bacteriophora* y *H. atacamensis* (Bruno *et al.*, 2020); en Colima *S. diaprepesi* (Molina *et al.*, 2009); en Tabasco *H. indica* (Cortez, Morales & Adams, 2003); en Sinaloa *H. indica* (Meza *et al.*, 2014),

*Rhabditis blumi* (Leyva *et al.*, 2018; Montoya, 2012), *Rhabditis ranai*, *Distolabrellus veechi* (Montoya, 2012) ;en Tamaulipas *H. mexicana* (Nguyen *et al.*, 2004); en Hidalgo *S. carpocapsae* (Maciel, Rodríguez & Chavarría, s.f.); en Queretaro *Pristionchus americanus* (Islas, Torres & Gijón, 2021); en Michoacán *S. riobrave* (Bruno *et al.*, 2020); en Sonora se tiene registrada a *H. sonorensis* (Stock *et al.*, 2009); En Yucatán *H. indica* (Ávila *et al.*, 2021); En durango *H. mexicana* (Bruno *et al.*, 2020) y para el estado de Morelos se tienen identificadas las especies *Oscheius myriophila* (Castro, 2014; Del Rocio *et al.*, 2020), *H. indica* (Sotelo *et al.*, 2017; Salgado *et al.*, 2017; 2019), *H. bacteriophora* (Villanueva *et al.*, 2017), *Heterorhabditoides chongmingensis* y *Caenorhabditis brenneri* (Castro, 2014).

**Cuadro 1.** Lista de especies de nemátodos entomopatógenos aisladas en México.

<i>n.º de especies</i>	<i>Especies</i>	<i>Autores y año</i>	<i>Sustrato/insecto</i>	<i>Localidad</i>
1	<i>H. indica</i>	Cortez, Morales & Adams, 2003; Grifaldo <i>et al.</i> , 2019; Bruno <i>et al.</i> , 2020; Salgado <i>et al.</i> , 2017; 2019; Meza <i>et al.</i> , 2014; Ávila <i>et al.</i> , 2021	Suelo	Tabasco, Veracruz, Oaxaca, Morelos, Sinaloa, Yucatán
		Sotelo <i>et al.</i> , 2017	<i>Sphenophorus incurrens</i>	Morelos
2	<i>H. bacteriophora</i>	Bruno <i>et al.</i> , 2020; Villanueva <i>et al.</i> , 2017	Suelo	Zacatecas, Jalisco, Guanajuato, Morelos
3	<i>H. atacamensis</i>	Bruno <i>et al.</i> , 2020	Suelo	Guanajuato
4	<i>H. mexicana</i>	Nguyen <i>et al.</i> , 2004;	Suelo	Tamaulipas, Oaxaca,

		Girón <i>et al.</i> , 2012; Bruno <i>et al.</i> , 2020		Guanajuato, Durango
5	<i>H. sonorensis</i>	Stock <i>et al.</i> , 2009	<i>Dicerorpocta ornea</i>	Sonora
6	<i>S. riobrave.</i>	Bruno <i>et al.</i> , 2020; Grifaldo, 2011; Grifaldo <i>et al.</i> , 2019.	Suelo	Michoacán, Veracruz
7	<i>S. feltiae</i>	Ruiz <i>et al.</i> , 2003; Girón <i>et al.</i> , 2012	Suelo	Oaxaca
8	<i>S. carpocapsae</i>	Aquino <i>et al.</i> , 2006; Girón <i>et al.</i> , 2012; Maciel, Rodríguez & Chavarría, 2010.	Suelo	Oaxaca, Hidalgo
9	<i>S. websteri</i>	Delgado <i>et al.</i> , 2015	Suelo	Oaxaca
10	<i>S. ralatorei</i>	Grifaldo-Alcántara <i>et al.</i> , 2017	Suelo	Veracruz
11	<i>S. diaprepesi</i>	Molina <i>et al.</i> , 2009	Suelo	Colima
12	<i>S. bicornutum</i>	Grifaldo-Alcántara <i>et al.</i> , 2019	Suelo	Veracruz
13	<i>S. certophorum</i>	Grifaldo-Alcántara <i>et al.</i> , 2019	Suelo	Veracruz
14	<i>Oscheius myriophila</i>	Castro, 2014; Del Rocio <i>et al.</i> 2020	Suelo	Morelos
15	<i>Heterorhabditoides chongmingensis</i>	Castro, 2014	Suelo	Morelos
16	<i>Caenorhabditis brenneri</i>	Castro, 2014	<i>Diatraea magnifactella</i>	Morelos
17	<i>Rhabditis blumi</i>	Leyva <i>et al.</i> , 2018; Montoya, 2012	Suelo	Sinaloa
18	<i>Rhabditis ranai</i>	Montoya, 2012	Suelo	Sinaloa
19	<i>Distolabrellus veechi</i>	Montoya, 2012	Suelo	Sinaloa
20	<i>Pristionchus americanus</i>	Islas, Torres & Gijón, 2021	Suelo	Querétaro



**Figura 4.** Registros de nemátodos entomopatógenos por estados en México.

### 3.7 Ventajas y desventajas en comparación con Insecticidas químicos

Los nemátodos entomopatógenos son una alternativa muy viable a los insecticidas químicos pues actúan rápidamente y no generan daños al medio ambiente (Del Pino, 2005). En México la mayor ventaja que poseen los insecticidas químicos sobre los nemátodos entomopatógenos es su facilidad de adquisición pues los insecticidas son producidos mundialmente y son más baratos en comparación con

los nemátodos entomopatógenos los cuales solo los producen algunos países (Vashisth, Chandel & Sharma, 2013) (Cuadro 3). Teniendo en cuenta que hoy en día lo principal es reducir el daño al medio ambiente, los nemátodos son una esperanzadora alternativa a los insecticidas convencionales, sin embargo, hace falta mayor divulgación de su existencia y mayor apoyo para reducir algunas desventajas que presentan actualmente (cuadro 4).

**Cuadro 2.** Ventajas y desventajas de los insecticidas químicos.

Ventajas	Desventajas
Su acción es inmediata, pueden acabar con distintos tipos de plagas.	Actúan matando a todo tipo de plagas e incluso a los enemigos naturales de las plagas.
Desaparece lentamente, por lo que sigue actuando tiempo después de su aplicación.	Los insectos y algunos otros parásitos pueden desarrollar razas resistentes a estos plaguicidas lo que hace necesario utilizar dosis mayores o productos de mayor efectividad.
Poca sensibilidad a factores ambientales (temperatura, radiación UV, humedad) que presentan la mayoría de estos productos.	Debido a su lenta degradación los plaguicidas químicos alteran el balance de la naturaleza desequilibrando los sistemas ecológicos.
Tienen facilidad de adquisición, pues se producen ampliamente a nivel mundial.	Tiene una peligrosidad alta ya que pueden llegar a causar daños irreversibles a órganos vitales de quienes están expuestos a ellos.
	El manejo de estos compuestos lleva consigo unos riesgos de intoxicación que deben ser tenidos en cuenta por las personas que los manipulan y aplican.

Tomado y modificado de Nicolás, 2011.

**Cuadro 3.** Ventajas y desventajas de los nemátodos entomopatógenos.

Ventajas	Desventajas
Rápida acción, matan al insecto en un rango de 24 a 48 horas	Son sensibles a altas temperaturas y a la deshidratación, por lo que solo se pueden aplicar en horarios donde los rayos del sol y la temperatura sean bajos.
Tienen movilidad por lo que pueden llegar a lugares en el suelo donde insecticidas convencionales no podrían.	Algunos Insectos tienen comportamientos que evaden y dificultan la entrada de los nemátodos.
Una vez que el insecto muere los JI salen y pueden permanecer meses en el medio, actuando tiempo después de la aplicación.	El sistema inmune de algunos insectos puede inactivar la liberación de las bacterias que liberan la toxina mortal.
Se reproducen en el insecto, pudiendo dar lugar a un efecto multiplicador de la dosis inicial.	Enemigos naturales como protozoos, hongos, ácaros, nemátodos, turbelarios, etc., pueden reducir sus números.
Son resistentes a algunos plaguicidas por lo que se pueden combinar.	Difíciles de conseguir en el mercado, solo se producen en el extranjero.
No generan residuos por lo que no contaminan al medio ambiente.	
No se necesita el uso de equipo de protección personal para su aplicación.	
Se pueden aplicar con equipos convencionales (pulverizadores, inyectoras, mediante el riego, etc.)	

Fuente: Del Pino, 2005.

### **3.8 Cepas aplicadas en algunas de las plagas más comunes en México y Facilidad de adquisición**

Debido al amplio rango de órdenes que abarcan los nemátodos entomopatógenos y la rapidez con la que actúan, cada vez hay un mayor número de investigaciones que se enfocan en probar su efectividad en las plagas de importancia económica. Sin embargo, todavía hay casos donde se usan cepas exóticas (Cuadro 5). Esto puede causar un problema en el conocimiento que se tenga sobre la efectividad de cada especie, pues si bien las especies pueden ser las mismas, el origen de cada una puede generar una variación en la efectividad sobre las plagas, teniendo en cuenta que las cepas nativas tienen un mejor desempeño contra organismos de la misma zona en comparación con algunas cepas exóticas (Shapiro-Ilan *et al.*, 2006).

Actualmente la única forma de conseguir nemátodos entomopatógenos de manera comercial en México es mediante la empresa de origen holandés Koppert Biological Systems, la cual tiene sus instalaciones en el estado de Querétaro. Los precios por tratamiento rondan arriba de 500 dólares, pues además deben ser importados desde su país de origen, por lo que los hacen prácticamente imposibles de adquirir para un agricultor promedio.

**Cuadro 4.** Especies de nemátodos entomopatógenos usadas contra plagas comunes en México.

Nematodo	Origen	Plaga	Afectaciones	Referencia
<i>H. indica</i>	Nativa	<i>Sphenophorus incurrens</i> <i>Gyllenhal</i> <i>Aeneolamia</i> y <i>Prosapia</i>	Caña de azúcar  Salivazo	Sotelo <i>et al.</i> , 2017  Grifaldo-Alcántara <i>et al.</i> , 2019
		<i>Aedes aegypti</i>	La fiebre amarilla, el dengue, la fiebre del Zika y la dirofilariasis canina	Ávila <i>et al.</i> , 2021
<i>H. bacteriophora</i>	Nativa	<i>Bradysia difformis</i> ,	Cultivo de nochebuena,	Villanueva <i>et al.</i> , 2017
	Comercial	<i>Sphenophorus incurrens</i> <i>Gyllenhal</i>	Agave	Bolaños, Vega & Cruz 2006
<i>S.bicornutum</i>	Nativa	<i>Aeneolamia</i> y <i>Prosapia</i>	Salivazo	Alcántara <i>et al.</i> , 2019
<i>S. carpocapsae</i>	Comercial	<i>Sphenophorus incurrens</i>	Agave	Bolaños, Vega & Cruz 2006
<i>S.Certophorum</i>	Nativa	<i>Aeneolamia</i> y <i>Prosapia</i>	Salivazo	Alcántara <i>et al.</i> , 2019
<i>S. riobrave</i>	Nativa	<i>Aeneolamia</i> y <i>Prosapia</i>	Salivazo	Alcántara <i>et al.</i> , 2019
<i>S. feltiae</i>	Comercial	<i>Bradysia difformis</i> <i>Sphenophorus incurrens</i> <i>Gyllenhal</i>	Cultivo de nochebuena Agave	Villanueva <i>et al.</i> , 2017 Bolaños, Vega & Cruz 2006
<i>Steinernema</i> sp	Nativa	<i>Aeneolamia albofasciata</i> ; <i>Phyllophaga</i> , <i>Triodonyx lalanza</i> <i>Musca domestica</i>	Salivazo  Caña de azúcar  Enfermedades intestinales e infecciones oculares	Parada <i>et al.</i> , 2019 Romero <i>et al.</i> , 2020 Arriaga & Cortez, 2018
<i>Heterorhabditis</i> sp	Nativa	<i>Aeneolamia albofasciata</i> <i>Musca domestica</i>  <i>Aedes aegypti</i>	Salivazo  Enfermedades intestinales e infecciones oculares  Fiebre amarilla, el	Parada <i>et al.</i> , 2019 Arriaga & Cortez, 2018 Ávila <i>et al.</i> , 2021

			dengue, la fiebre del Zika y la dirofilariasis canina.	
<i>Rhabditis ranai</i>	Nativa	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Maíz	Montoya, 2012
<i>Rhabditis blumi</i>	Nativa	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Maíz	Montoya, 2012
<i>Distolabrellus veechi</i>	Nativa	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Maíz	Montoya, 2012
<i>Pristionchus americanus</i>	Nativa	<i>Dendroctonus frontalis</i>	Bosques de pino	Islas, Torres & Gijón, 2021

## 4 JUSTIFICACION

Por mucho tiempo los insecticidas químicos han sido los principales controladores de plagas en la agricultura, sin embargo, es de suma importancia encontrar alternativas limpias ya que han provocado severos daños al medio ambiente y nuestra salud. Los nemátodos entomopatógenos son una alternativa limpia para ser aplicados en la agricultura. El aislamiento de nuevas especies contribuirá al conocimiento de la diversidad de nematodos del país, así como también permitirá futuros estudios para el control de plagas que afectan al estado de Morelos.

## 5 HIPOTESIS

Los datos bibliográficos indican que la mayoría de cepas aisladas en México han sido en suelos de cultivos agrícolas, por lo que se esperar encontrar nematodos en algunos de los cultivos de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.), ejote (*Phaseolus vulgaris* L.) o calabaza (*Cucurbita argyrosperma* Huber.).

## 6 OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo general

Aislar e identificar los nemátodos de suelos de cultivos de importancia económica en 2 localidades pertenecientes al municipio de Ayala, Morelos.

### 6.2 Objetivos específicos

- Aislar nemátodos entomopatógenos del suelo
- Identificar los nemátodos aislados de los suelos de cultivos
- Determinar las características fisicoquímicas del suelo colectado.

## MATERIALES Y METODOS

### 6.3 Material biológico

Se utilizaron larvas de *Tenebrio molitor* como cebo. Las larvas se colocaron en un tupper de plástico con salvado de trigo el cual sirvió como sustrato y alimento. Para hidratarlas se les agregó una zanahoria cortada en pequeñas partes cada dos días.



**Figura 5.** Tenebrios en salvado siendo alimentados con zanahoria

#### **6.4 Muestreo del suelo**

Durante las temporadas de verano, invierno y primavera se muestrearon 3 terrenos de cultivos de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.), 1 de ejote (*Phaseolus vulgaris* L.) y 1 de calabaza (*Cucurbita argyrosperma* Huber.) pertenecientes a la localidad de Moyotepec, coordenadas ;18°42'54.0"N 98°59'01.6"W; 18°42'53.7"N 98°59'03.7"W; 18°42'54.3"N 98°59'08.4"W; 18°42'51.3"N 98°59'07.0"W; 18°42'54.4"N 98°59'17.1"W; 3 de caña de azúcar de la localidad del Chivatero, coordenadas 18°41'26.8"N 98°59'29.2"W; 18°41'28.7"N 98°59'29.5"W; 18°41'27.5"N 98°59'25.3"W pertenecientes al municipio de Ayala.

Para la toma de muestras se siguió el protocolo modificado por Orozco, Lee & Stock (2014). Se tomaron 5 muestras de 200 gramos de suelo por terreno a una profundidad de 20cm mediante el método de muestreo aleatorio. En total se obtuvieron 40 muestras de suelo por cada temporada. Las muestras se almacenaron en bolsas herméticas de polietileno para evitar la pérdida de humedad, se rotularon con fecha y localidad.



Figura 4. Terreno de caña ubicado en la colonia el Chivatero.

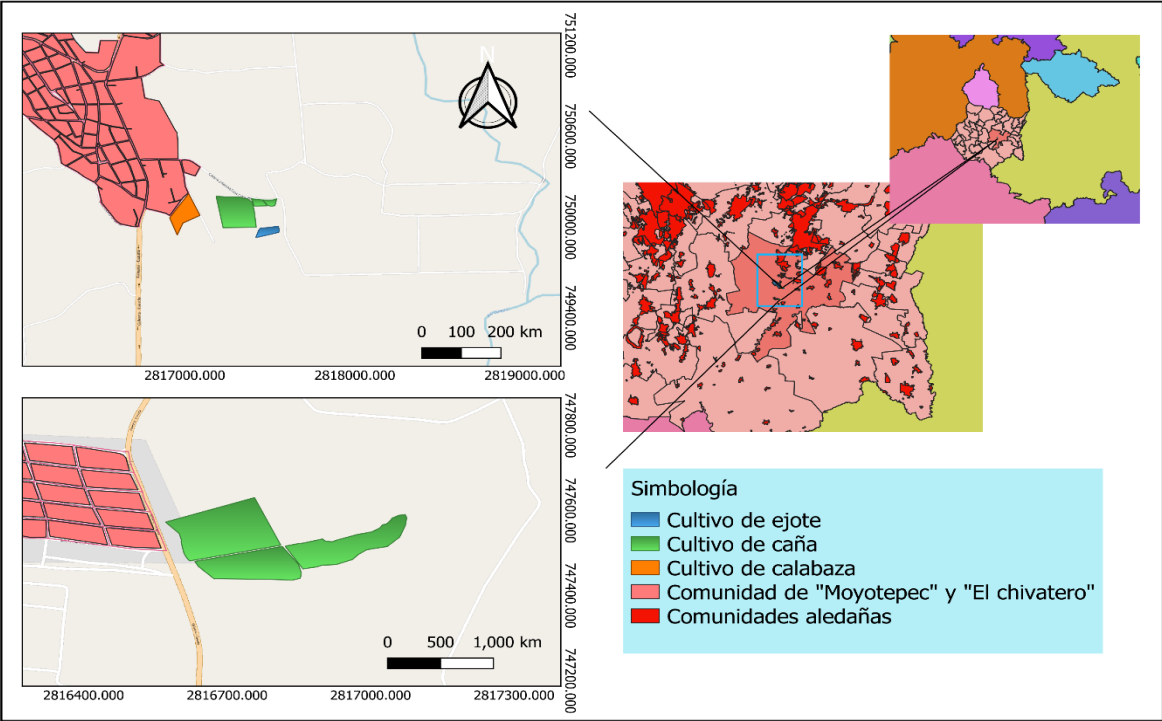


Figura 6. Mapa de los cultivos muestreados

## 6.5 Aislamiento de nemátodos del suelo

Se utilizó el protocolo modificado por Orozco, Lee & Stock (2014). El sustrato se humedeció con agua mediante un rociador, se pusieron 200 gramos de suelo humedecido en un recipiente con plástico, se le agregaron 5 larvas de *Tenebrio molitor* y se cubrieron los recipientes con una tapa. Los recipientes se mantuvieron en un lugar oscuro a una temperatura entre 22 – 25 °C. Cada 3 días se revisaron las larvas para determinar si habían sido infectadas.



**Figura 7.** Tenebrios utilizados de cebo en recipientes de plásticos con suelo muestreado.

Como sugerencia, se utilizó el método de flotación de Willis Molloy (Núñez & Cordoví, 2004). Se cambió el sustrato de heces a suelo de cultivo. Se propone como una alternativa rápida y barata para la recuperación de nemátodos del suelo.

## **6.6 Recuperación de los nemátodos de los cadáveres infectados**

Se utilizó el protocolo modificado por Orozco, Lee & Stock (2014).

Se pusieron cajas Petri de 50 a 60 mm de diámetro dentro de una caja más grande de 100 mm. Se colocó un papel de filtro cualitativo Whatman Grado 1 circular dentro del disco más pequeño y se procedió a colocar los cadáveres infectados sobre el papel filtro de modo que ninguno se tocara entre sí para evitar contaminación. Se le agregó 20 ml de agua destilada estéril a la caja más grande y se cubrió con la tapa de la caja Petri más grande. Las trampas se mantuvieron a temperatura ambiente hasta que los juveniles infecciosos (JI) emergieron de las larvas. Se recolectó el agua con los juveniles infecciosos retirando el plato más grande de la trampa, se vertió el agua con nemátodos en un vaso de precipitado y se dejó que los nemátodos se depositaran al fondo del vaso. Se enjuagaron y se decantaron los nemátodos agregando más agua. Este paso se repitió de 2 a 3 veces hasta que el agua se limpiara. Por último, se colocó la suspensión de nemátodos en un matraz de cultivo de tejidos (250 ml) para posteriormente poder fijar a los nemátodos.

## **6.7 Fijación de los nemátodos**

La fijación de los nemátodos se hizo siguiendo los métodos detallados por Ryss, (2017). Se prepararon dos tubos Eppendorf de 1,5 ml y se utilizaron 2 “flotadores” fabricados con tapones de rosca de plástico. A ambos tapones se les hizo un agujero redondo de 8 mm de diámetro, siendo ligeramente menor al diámetro del tubo Eppendorf para garantizar la sujeción y flotabilidad. Uno de los tubos se llenó con fijador formalina al 4%, mientras que la suspensión de nemátodos se colocó en el segundo tubo. Esta última se puso en posición vertical durante 10 minutos para que los nemátodos se depositaran en el fondo. Luego se retiró el

sobrenadante, reteniendo el agua en 1/3 de la parte cónica del tubo (aproximadamente 150 µl). El tapón se giró boca arriba y se insertó uno de los tubos firmemente en el orificio del tapón. Se colocaron ambos tubos en los "flotadores". Se calentó el agua hasta la ebullición y posteriormente se vertió en otro recipiente. El tubo flotante con fijador se colocó en el recipiente con agua caliente durante 3 (2-4) minutos. A continuación, se retiró el tubo con la formalina calentada y se transfirió con una pipeta de plástico al segundo tubo con la suspensión de nemátodos. El tubo con los nemátodos y el fijador se cerró y se transfirió de nuevo al baño de agua. Se mantuvo el tubo con los nemátodos en agua caliente durante al menos 1 hora. Por último, los nemátodos fijados se mantuvieron al menos 48 horas a temperatura ambiente antes de ser identificados y procesados para una preparación de portaobjetos.

## **6.8 Identificación y descripción de los nemátodos**

Con la ayuda de un microscopio óptico se hizo la descripción morfológica de los nemátodos. Se utilizaron las claves proporcionadas por Siddiqi (2000). Las espículas y gubernáculos de los machos son importantes en la determinación de especies por lo que se diseccionarán para ser descritas aparte.

## **6.9 Procesamiento para una preparación de portaobjetos**

Se siguió el método de procesamiento detallado por Ryss, (2017). Para el procesamiento se hizo una saturación a los nemátodos con un "cóctel" de glicerol, de forma lenta y gradual. En el centro de un porta objetos se formó un anillo hidrofóbico utilizando hilo de algodón enrollado en 5 madejas de 20 mm de diámetro. Se humedeció el hilo para facilitar el enrollado. Sobre el anillo se añadieron dos trozos de mezcla de cera de abeja y parafina en superposición. El portaobjetos con el anillo y los trozos de cera se calentaron en una placa a 85 °C. La mezcla de cera se fundió y fluyó a lo largo del anillo de hilo, formando así un preciso anillo hidrofóbico adherido a la superficie del portaobjetos. Después de que se enfrió a temperatura ambiente y se solidificó, se colocaron dos gotas de

glicerol en la parte inferior del anillo y se extendieron sobre la superficie del vidrio con un palillo de algodón para formar una fina capa de glicerol. Se colocaron tres gotas de agua destilada sobre el glicerol, para formar una capa que protegiera a los nemátodos del contacto directo con el glicerol concentrado.

Los nemátodos fijados se lavaron con agua destilada tres veces, eliminando así el exceso de fijador. El agua con los nemátodos fijados se agitó y se vertió lentamente desde arriba sobre la combinación de glicerol y agua dentro del anillo de cera. Como resultado, los nemátodos se mantuvieron arriba en la capa de agua, mientras que la fina capa de glicerol quedó en la parte inferior. Esta lente "cóctel" se mantuvo durante la noche al aire libre a temperatura ambiente, cubierta del polvo, permitiendo la evaporación del agua y saturando los tejidos de los nemátodos.

### **6.10 Determinación de las características fisicoquímicas del suelo**

Se determinó la textura del suelo por el método de capas de sedimentación modificado por Marimón & Viza (1995) mediante la fórmula:

(Arenas) % fracción grosera =  $L1 \text{ mL} / 50 \text{ mL} * 100$

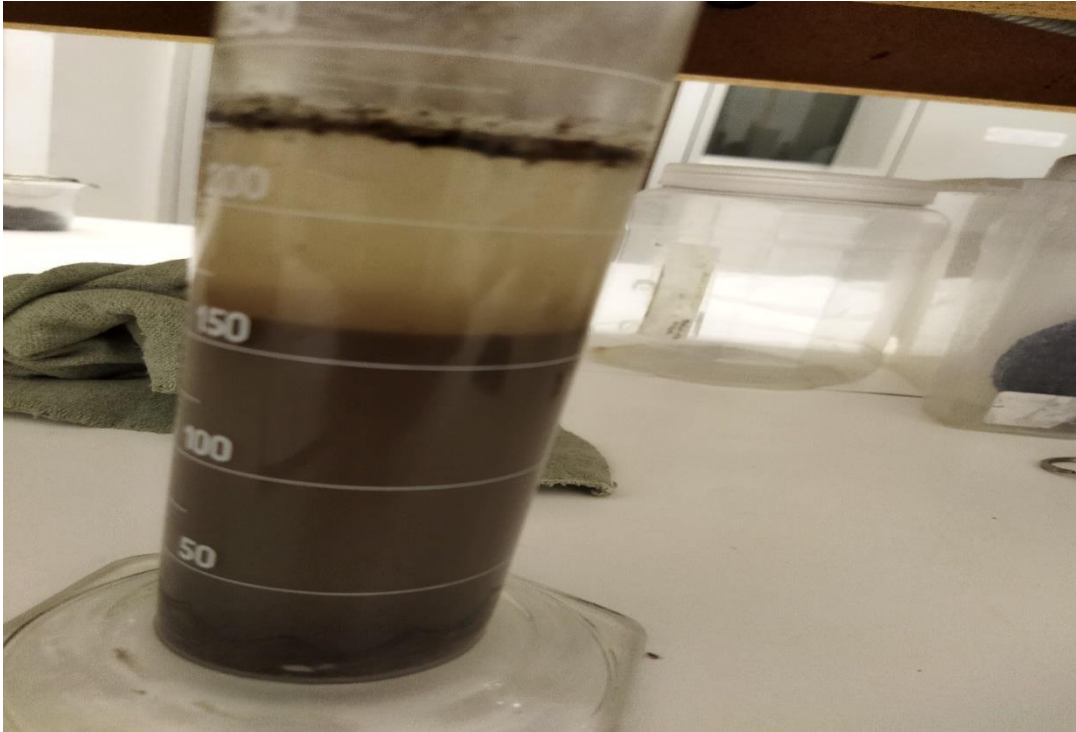
(Limos) % fracción media=  $(Lz \text{ mL} - L1 \text{ mL}) / 50 \text{ mL} * 100$

(Arcillas) % fracción fina =  $100 - \% \text{ f. grosera} - \% \text{ f. media}$

Donde:

(L1) = línea de sedimentación a los 60 segundos

(Lz) = línea de sedimentación a los 10 minutos



**Figura 8.** Sedimentación de las partículas de arena, limo y arcilla después de los 10 minutos.

Para la determinación de la materia orgánica se siguió el método de calcinación propuesto por Schulte & Hopkins (1996). Se pesaron 5 gramos de tierra de cada cultivo y fueron depositados en capsulas de porcelana, las cuales fueron sometidas a una temperatura de 105 ° C en un horno de secado Boekel Scientific® durante 24 horas. Pasadas las 24 horas las muestras se enfriaron y se pesaron en una balanza analítica Velab™, posteriormente se sometieron a una temperatura de 360° C en un horno Lumistell® durante 2 horas. Una vez pasado el tiempo se sacaron las muestras y se dejaron enfriar para volver a ser pesadas en la balanza analítica Velab™. El cálculo de la materia orgánica se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ MOS} = \frac{\text{peso a } 105^{\circ}\text{C} - \text{peso a } 360^{\circ}}{\text{peso a } 105^{\circ}\text{C}} * 100$$



**Figura 9.** Capsulas de porcelana con muestras de tierra a punto de ser sometidas a calor.

El pH se obtuvo usando un medidor de suelo 4 en 1



**Figura 10.** Medidor de suelo 4 en 1 analizando el pH de un suelo de caña

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Muestreo y aislamiento de los nemátodos entomopatógenos

Se obtuvieron un total de 40 muestras de suelo en verano, 40 en invierno y 40 en primavera. Ninguna muestra resulto positiva mediante la técnica del cebo, sin embargo, se utilizó la técnica de Willis para recuperar nematodos directamente del suelo. Un total de 6 muestras resultaron positivas, 1 muestra con nemátodos para verano, 2 en invierno y 3 en primavera (5% del total) todas en el mismo terreno destinado a la caña ubicado en la colonia Moyotepec.

### 7.2 Análisis de suelo

Las características fisicoquímicas del suelo se midieron una sola vez debido a la difícil disposición de materiales y herramientas producto de la pandemia. De manera general los suelos se clasificaron en Francos arcillosos y Francos arenosos, presentaron un pH neutro (7.0-7.5) y una materia orgánica con variaciones de un mínimo de 1.73 hasta un máximo de 3.26 %. Los nemátodos recuperados se encontraron en un suelo clasificado como Franco arcilloso arenoso que estaba destinado a la caña

**Cuadro 5.** Características fisicoquímicas de los suelos muestreados

Colonia	Cultivo	pH	M.O (%)	Texturas (%)			Clasificación
				Arena	Limo	Arcila	
Moyotepec	Caña	7	2.47	50	20	30	Franco arcilloso arenoso
	Caña	7	3.26	60	20	20	Franco arenoso
	Caña	7	1.73	60	20	20	Franco arenoso
	Ejote	7	3.21	40	30	30	Franco arcilloso
	Calabaza	7.5	2.23	50	10	40	Arcillo arenoso
EI	Caña	7.5	2.47	70	10	20	Franco

<b>Chivatero</b>							arenoso
	Caña	7	2.81	40	20	40	Franco arcilloso
	Caña	7	2.62	40	20	40	Franco arcilloso

### **7.3 Identificación y descripción de los nemátodos**

Debido a los inconvenientes ocasionados por la pandemia los nemátodos no pudieron ser identificados con microscopio electrónico de barrido y análisis de ADN. Se identificaron tres especies diferentes basados en la morfología y se procedió a hacer una descripción general mediante un microscopio óptico.

#### **7.3.1 Nemátodo especie 1 (juvenil)**

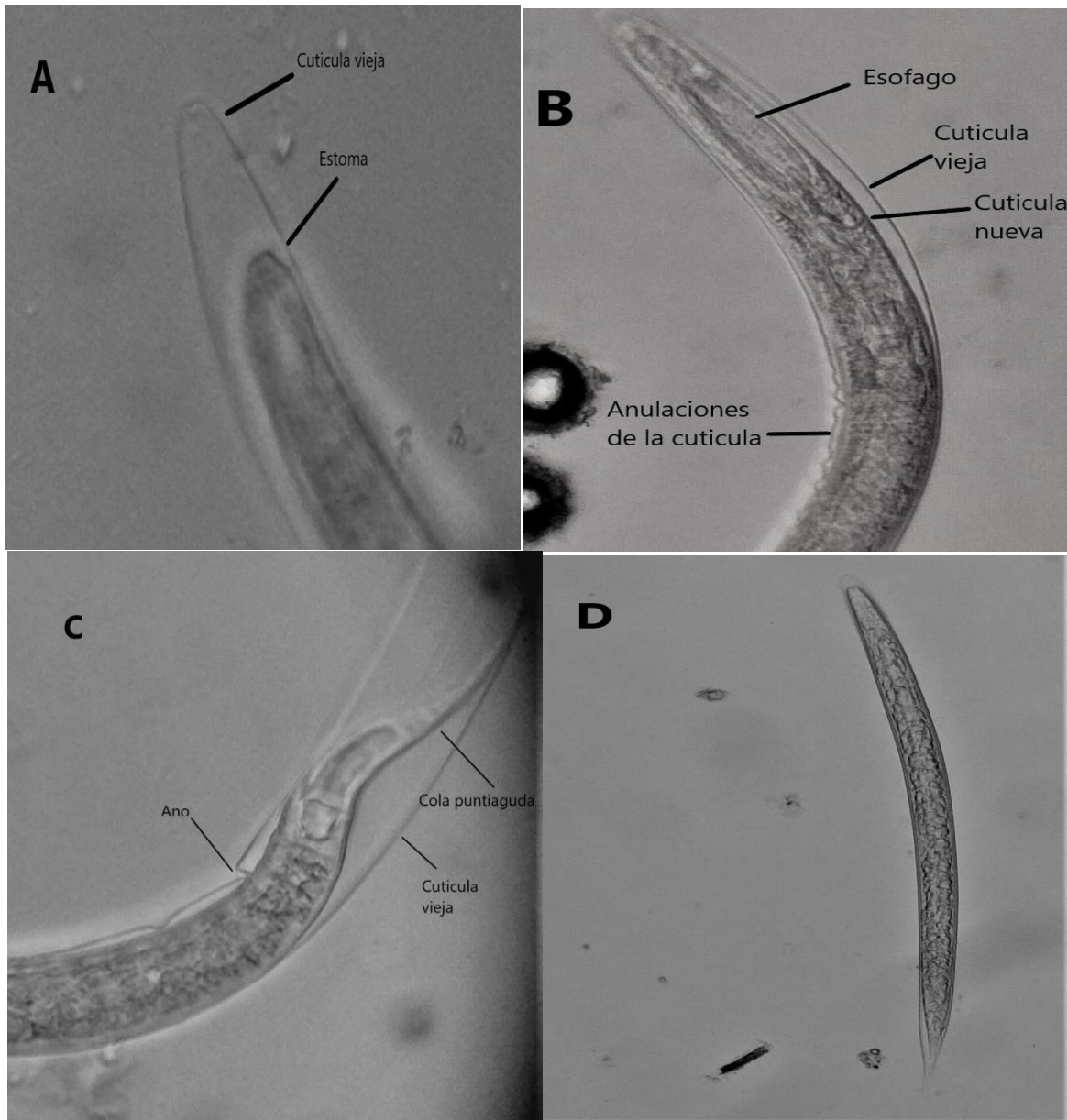
Cuerpo corto y delgado. Forma de arco al morir (Fig. 9 D). La región cefálica tiene forma de botella (Fig. 9 A). La cutícula vieja es claramente visible y presenta anulaciones en la parte media del cuerpo (Fig. 9 A, B, C, D). Esófago visible, pero con sus partes poco diferenciadas (Fig. 9 B). Ano visible y con Cola puntiaguda (Fig. 9 C).

#### **7.3.2 Nemátodo especie 2 (Hembra)**

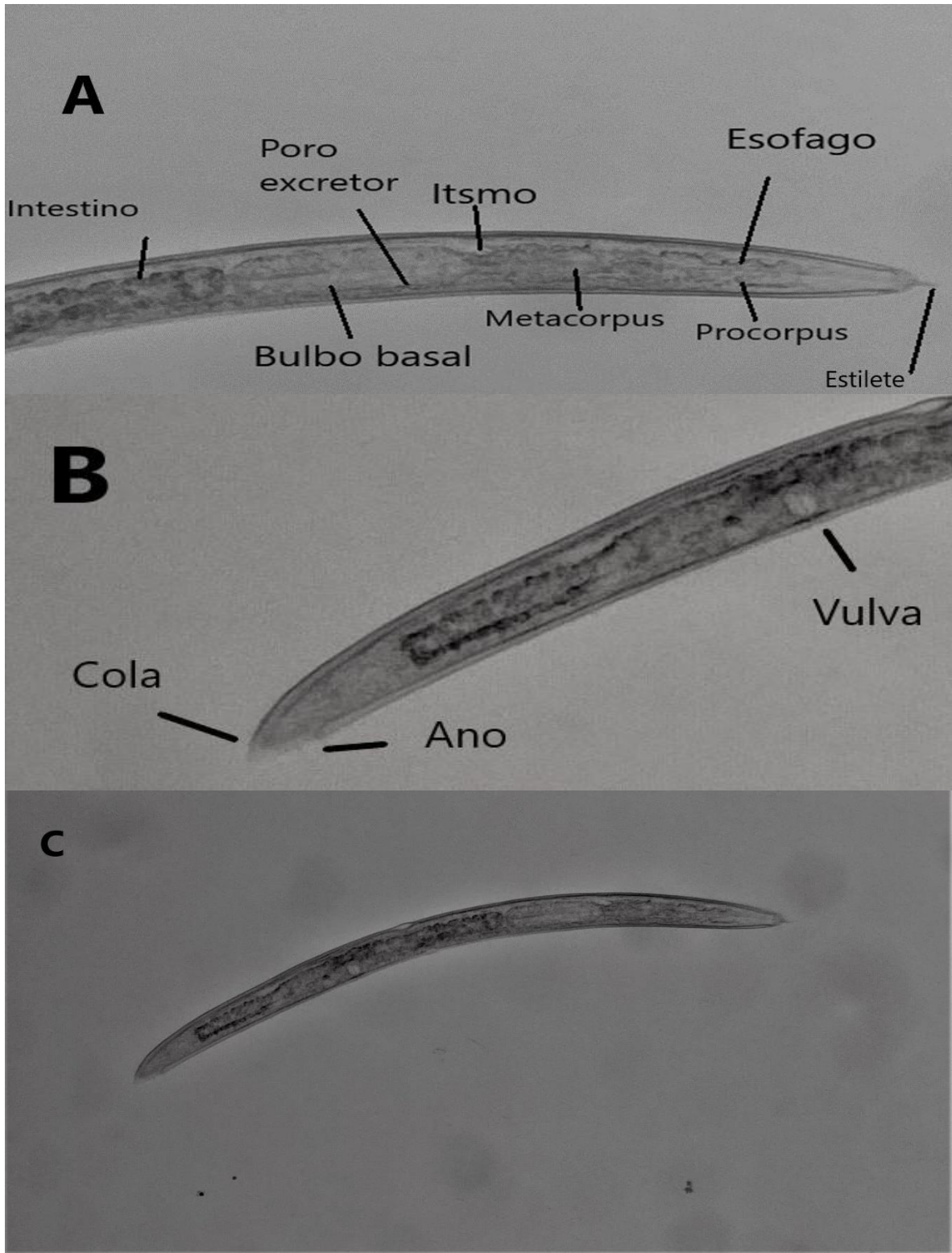
Cuerpo corto y delgado. Forma de arco al morir (Fig.10 C). Región cefálica pequeña, esclerotizada y redondeada; presenta estomaestilete de tamaño corto (Fig. 10 A). Esófago rhabditiforme, ocupa más de un tercio del tamaño total del cuerpo (Fig. 10 A). Procorpus cilíndrico, metacorpus visible y corto; istmo con un ligero adelgazamiento; bulbo basal largo y cilíndrico; poro excretor ubicado en la zona anterior del bulbo (Fig. 10 A). Vulva ubicada en el tercio final del cuerpo de forma ventral (Fig. 10 B). Cola corta y en forma de cono (Fig. 10 B).

#### **7.3.3 Nemátodo especie 3**

Cuerpo alargado y delgado. Forma de J al morir (Fig.11). Región cefálica pequeña, esclerotizada y con forma de cono; presenta un estomaestilete corto (Fig. 11). La mayor parte del cuerpo es poco distinguible.



**Figura 11.** Región anterior de nemátodo 1 Juvenil (A y B). Región posterior (C). Juvenil muerto en forma de arco. (D)



**Figura 12.** Región anterior del nemátodo 2 Hembra (A). Región posterior (B). Hembra muerta en forma de arco (C).



**Figura 13.** Nemátodo 3 en forma de J

## 8 DISCUSION

### 8.1 Diagnosis

Los nemátodos 2 y 3 presentaron grandes diferencias en el tamaño, por lo que se consideran especies diferentes. Ambos tuvieron similitudes en la región cefálica, pues sus respectivas cabezas son pequeñas y esclerotizadas. El nemátodo 2 cuenta con un esófago de mayor tamaño que el del 3. Es claro que son nemátodos fitoparásitos, pues ambos presentan un estilete característico de este grupo ya que lo usan para penetrar las raíces de las plantas (Bongers & Esquivel, 2011). Se puede concluir que ambas especies pertenecen a la familia Heteroderidae principalmente porque fueron encontradas junto a quistes característicos de la familia (Fig. 12), que son el resultado de la transformación de las hembras para proteger sus huevos (Siddiqi, 2000). Además de que comparten características como la esclerotización y forma de la cabeza, presencia de estomaestilete y plantas que suelen parasitar como la caña de azúcar (Eisenback, 2002). Desafortunadamente las condiciones de la pandemia han imposibilitado el uso de mejores herramientas de trabajo, por lo que la identificación hasta nivel de género y especie se realizara en posteriores estudios.

El nemátodo 1 se puede saber que es un juvenil ya que la cutícula vieja está claramente diferenciada de la nueva, por lo que es probable que estaba a punto de ser mudada. Los juveniles suelen ser parecidos a los adultos, sin embargo, en especies con dimorfismo sexual son filiformes, posteriormente los adultos cambian de forma (Chaves *et al.*, 2019). Los juveniles de la familia Heteroderidae ya presentan un estilete por lo que es probable que pertenezca a otra (Siddiqi, 2000). Los juveniles son muy parecidos entre especies y es más complicado identificarlos sin las herramientas necesarias, así que se hará su identificación en posteriores estudios.



**Figura 14.** Quiste recuperado del suelo cañero.

## **8.2 Factores fisicoquímicos del suelo**

Los nemátodos recuperados del suelo se encontraron en un cultivo de caña cuyo suelo fue clasificado como Franco arcilloso arenoso que coincide con lo mencionado por Ávila *et al.* (2021) quienes encontraron NEP en suelos del mismo tipo utilizados para cultivos de campo.

De manera general el suelo de tipo Franco arcilloso arenoso parece ser un mejor medio por el cual los nemátodos se pueden desplazar, pues así lo confirman trabajos anteriores donde se han obtenido mayores muestras positivas en este tipo de suelo en comparación con otros (Montores, Cortez & Zepeda, 2016; Luévano *et al.* (2006). Otros tipos de suelo que también son considerados un buen medio para nemátodos son del tipo Franco Arenoso y Franco Arcilloso (Agui & Betsabe, 2018; Luévano *et al.*, 2006).

Probablemente los suelos Franco arcilloso arenoso tengan los porcentajes ideales de arena y arcilla que les permite una mejor movilidad en comparación a otros.

El pH del suelo fue neutro (7 – 7.5) similar o cercano a lo reportado por otros investigadores como Orbegoso (2014), Saavedra (2019) y Ávila *et al.* (2021) cuyo pH analizado varió de 7.3 a 8.4. Se sabe que a concentraciones más ácidas o alcalinas (menor a 4 y mayor a 8) puede disminuir la supervivencia (kaya, 1993; Kung *et al.*, 1990; Fischer & Führer, 1990), aunque se tienen registros como el de Luévano *et al.* (2006) que reportan la presencia de nemátodos en suelos con pH de hasta 9.2.

En general el contenido de materia orgánica varió entre un rango bajo y medio (1.73 – 3.26%). Quizás esta sea una de las razones por la cual solo se encontraron nemátodos en un solo sitio pues varios trabajos reportan mayor presencia en suelos con alto contenido de materia orgánica (Caicedo & Belloti, 1996; Montores, Cortez & Zepeda, 2016; Islas, Torres & Gijón, 2021), sin embargo, también se han encontrado en suelos con bajos y medios contenidos de materia orgánica (Montores, Cortez & Zepeda, 2016; Islas, Torres & Gijón, 2021; Sandhi, 2020).

A pesar de que en este trabajo no se analizó la temperatura y humedad, estas juegan un papel muy importante que permite la presencia de nemátodos en el suelo. Se tiene documentado una mayor presencia de nemátodos a temperaturas en un rango de 15 °C a 25 °C, al igual que en lugares con una humedad moderada, ya que la facilita la movilidad y mantienen la hidratación de los nemátodos (García del Pino, 2008; Montoussé, Argibay & Vázquez, 2008; Griffin, 1993; Womersley, 1990).

La presencia de NEP es muy amplia pues se tienen registros desde áreas con suelos no perturbados hasta suelos de cultivos. García del Pino (2008) muestreó 3 tipos de hábitat; suelos cultivados, bosques y prados, en donde encontró un mayor número de muestras con presencia de nemátodos entomopatógenos en suelos cultivados. Similar a lo reportado por Romero *et al.* (2020), donde encontró

una alta incidencia de nemátodos del género *Steinernema* en suelos cultivados con caña de azúcar y maíz. Luévano *et al.*, (2006) obtuvieron una alta presencia de nemátodos entomopatógenos muestreados en sistemas agrícolas pues en 56.4% de los sitios geográficos muestreados resultaron positivos. Si bien la presencia de nemátodos en este trabajo fue mínima, los datos anteriores corroboran la idea de que los nemátodos están muy asociados a los cultivos. Contrario a lo mencionado anteriormente Mráček *et al.*, (2005) que encontraron una mayor presencia de nemátodos entomopatógenos en bordes y bosques que en plantaciones.

Tomando en cuenta lo anterior más que un tipo de hábitad específico, son las condiciones del suelo en conjunto con otras encontradas en la superficie las que propician un ambiente idóneo para su presencia. Diversos autores señalan que una mayor diversidad de insectos, así como la materia orgánica y la biomasa microbiana de carbono son importantes en la presencia de nemátodos entomopatógenos, ya que una mayor cantidad de nutrientes en el suelo genera una mayor diversidad de organismos. (Vidaurre, Rodríguez & Uribe, 2020; Briar *et al.*, 2007).

### **8.3 Distribución de las familias Heterorhabditidae y Steinernematidae**

Las familias Heterorhabditidae y Steinernematidae son las más estudiadas por su gran número de especies y distribución. Dentro de la literatura hay un mayor número de registros de especies pertenecientes a los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis*. Bruno *et al.*, (2020) encontraron una mayor presencia de especies pertenecientes al género *Heterorhabditis* y solo una del género *Steinernema*, similar a lo reportado por otros autores donde encontraron una mayor presencia del género *Heterorhabditis* (Banu, Jothi & Narkhedkar, 2007; Kary *et al.*, 2009; Giayetto & Cichón, 2006; Ávila *et al.*, 2021). Estos datos no concuerdan con

Romero *et al.* (2020) quien reporta una alta incidencia de nemátodos del género *Steinernema* en suelos de caña de azúcar, similar a Vidaurre, Rodríguez & Uribe (2020) que encontraron presencia del género en 19 de 20 muestras positivas, siendo el género *Heterorhabditis* el menos abundante. Una gran cantidad de otros investigadores también mencionan una dominancia del género *Steinernema* en comparación con *Heterorhabditis* (Romero *et al.*, 2020; Montores, Cortez-Madrigal & Zepeda, 2016; Campos-Herrera *et al.*, 2010; Parada-Domínguez *et al.*, 2019; Zepeda *et al.*, 2014; Seenivasan *et al.*, 2012; Llano & Giraldo, 2016; Montoussé, Argibay & Vázquez, 2008; Barceló, Riascos & Vallejo, 2011; Chinchay, Arias & Tesen, 2018).

Los datos registran a nivel mundial una mayor cantidad de especies de género *Steinernema* que de *Heterorhabditis* (Bhat, Chaubey & Askary, 2020). Si se compara el número de registros de ambos géneros es claro el dominio del género *Steinernema*. Se debe tomar en cuenta que la zona geográfica puede influir en la presencia de cada género, pues en el caso de *Heterorhabditis* diversos autores los asocian a zonas próximas al mar, ya que hay una preferencia hacia los suelos arenosos con climas cálidos y tropicales (Montoussé, Argibay & Vázquez 2008; Kanga *et al.*, 2012; Hara *et al.*, 1991; Hominick, 2002; Griffin *et al.*, 2000; Rosa *et al.*, 2000). La gran distribución de las especies del género *Steinernema* probablemente se debe a que están adaptadas a un mayor rango de hábitats y factores fisicoquímicos (Zepeda *et al.*, 2014; Chinchay, Arias & Tesen, 2018). A pesar de la amplia distribución de estas familias, a falta de determinar la especie 1, en este estudio no fueron encontrados nemátodos perteneciente a las familias antes mencionadas.

## 9. CONCLUSIÓN

Se aislaron 3 diferentes especies de nemátodos del mismo suelo cañero utilizando la técnica de Willis Molloy.

Las características fisicoquímicas encontradas en este trabajo coinciden con las de otros autores cuyos aislamientos fueron positivos para la presencia de nemátodos entomopatógenos.

Basados en los caracteres analizados y la presencia de quistes se concluye que las especies 2 y 3 son nemátodos fitopatógenos pertenecientes a la familia Heteroderidae.

Se espera analizar el nemátodo 1 (juvenil) en posteriores trabajos con las herramientas adecuadas para determinar la especie a la que pertenece.

En este estudio se comprobó que la técnica de Willis Molloy es excelente para la recuperación tanto de larvas como de nemátodos adultos del suelo, además de ser rápida y barata. Sin embargo, no indica si los nemátodos son entomopatógenos en comparación con la técnica de cebo.

La pandemia ha hecho un reto poder hacer este trabajo de la manera adecuada, por lo que se espera seguir con la línea de investigación en un futuro cercano.

## LITERATURA

Almazán García, C., Armendáriz González, I., & Rodríguez Solano, R. (2004). Estudios preliminares con nemátodos entomopatógenos para el control biológico de la mosca del cuerno, *Haematobia irritans* L. (Diptera: Muscidae). *Veterinaria Mexico*.

Agui, B., & Betsabe, E. (2018). Aislamiento e identificación de nemátodos entomopatógenos en el distrito de Yanahuanca-Daniel Carrión.

Aquino B., T., Ruiz V., J. e Iparraguirre C., M. 2006. Control biológico del picudo negro (*Scyphophorus interstitialis* Gyllenhal) con nemátodos y hongos entomopatógenos en agave en Oaxaca, México. *Revista UDO Agrícola* 6(1): 92-101.

Arriaga, A. A. M., & Cortez-Madrigal, H. (2018). Susceptibility of *Musca domestica* larvae and adults to entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae) native to Mexico. *Journal of Vector Ecology*, 43(2), 312-320.

Ávila-López, M. B., García-Maldonado, J. Q., Estrada-Medina, H., Hernández-Mena, D. I., Cerqueda-García, D., & Vidal-Martínez, V. M. (2021). First record of entomopathogenic nematodes from Yucatán State, México and their infectivity capacity against *Aedes aegypti*. *PeerJ*, 9, e11633.

Banu, J. G., Jothi, B. D., & Narkhedkar, N. (2007). Susceptibility of different stages of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to entomopathogenic nematodes. *International Journal of Nematology*, 17(1), 41.

Barceló, A. A. M., Riascos, G. O., & Vallejo, A. M. C. (2011). Aislamiento de nemátodos entomopatógenos en áreas de Buenaventura, Valle del Cauca, Colombia. *Fitosanidad*, 15(3), 153-157.

Bhat, A. H., Chaubey, A. K., & Askary, T. H. (2020). Global distribution of entomopathogenic nematodes, *Steinernema* and *Heterorhabditis*. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 30, 1-15.

Bolaños, T. A., Vega, J. R., & Cruz, M. I. (2006). Control biológico del picudo negro (*Scyphophorus interstitialis* Gyllenhal) con nemátodos y hongos entomopatógenos en agave en Oaxaca, México. *Revista Científica UDO Agrícola*, 6(1), 92-101.

Bongers, T., & Esquivel, A. (2011). Morfología de los nematodos curso de identificación. Universidad. Nacional, 1-42.

Briar, S. S., Grewal, P. S., Somasekhar, N., Stinner, D., & Miller, S. A. (2007). Soil nematode community, organic matter, microbial biomass and nitrogen dynamics in field plots transitioning from conventional to organic management. *Applied Soil Ecology*, 37(3), 256-266. DOI: 10.1016/j.apsoil.2007.08.004

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

Campos-Herrera, R., Piedra-Buena, A., Escuer, M., Montalban, B., & Gutierrez, C. (2010). Effect of seasonality and agricultural practices on occurrence of entomopathogenic nematodes and soil characteristics in La Rioja (Northern Spain). *Pedobiologia*, 53(4), 253-258.

Caicedo, A. M., & Belloti, A. C. (1996). Reconocimiento de nemátodos entomopatógenos nativos asociados con *Cyrtomenus bergi* Froeschner (Hemiptera: Cydnidae) en ocho localidades de Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*, 22(1), 19-24.

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

Cedano Saavedra, C. E. (2019). Nematodos entomopatógenos nativos para el control de ninfas de (*Proarna bergie*) en espárrago, Paján, La Libertad.

Ciche, T. A., Kim, K. S., Kaufmann-Daszczuk, B., Nguyen, K. C., & Hall, D. H. (2008). Cell invasion and matricide during *Photorhabdus luminescens* transmission by *Heterorhabditis bacteriophora* nematodes. *Applied and environmental microbiology*, 74(8), 2275-2287.

Chaves, E. J., Echeverría, M. M., Merlo Álvarez, H., & Salas, A. (2019). Clave para determinar géneros de nematodos del suelo de la República Argentina.

Chinchay, D. M. P., Arias, C. P. C., & Tesen, D. P. (2018). Nemátodos entomopatógenos aislados en terrenos de cultivo del distrito de Monsefú y Motupe de la región Lamnayeque. *Tzhoecoen*, 10(4), 585-592.

Cortez-Madriral, H., P. Morales-Salvador, and B. Adams. (2003). Primer registro en México del nematodo *Heterorhabditis indicus* Poinar. In: M. Vázquez-García, Perez Domínguez, J.F., K. Ibarra-Cortes, C. Balpuesta-Leon, R. Vazquez-Reyes, J. Cervantes-Rios, and N. Ibarra-Frias (eds.), *Memorias del XXVI Congreso Nacional de Control Biológico*. Sociedad Mexicana de Control Biológico, Texcoco, México. pp. 68–70.

Fimbres Cubillas, G., & Flores-Lara, Y. (2016). Potencialidad y retos del uso de nematodos entomopatógenos para el control biológico de plagas. I: Control biológico mediante una asociación simbiótica NEP-Bacteria. *Unison*, 11(1), 27-36.

Del Pino F, G. (2005). Los nemátodos entomopatógenos agentes de control de plagas. *El control biológico de plagas y enfermedades*, 87-112.

Del Rocio Castro-Ortega, I., Caspeta-Mandujano, J. M., Suarez-Rodriguez, R., Peña-Chora, G., Ramírez-Trujillo, J. A., Cruz-Pérez, K., ... & Hernández-Velázquez, V. M. (2020). *Oscheius myriophila* (Nematoda: Rhabditida) isolated in sugar cane soils in Mexico with potential to be used as entomopathogenic nematode. *Society of Nematologists* (via Exeley Incorporated).

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

Delgado-Gamboa, J. R., Ruíz-Vega, J., Aquino-Bolaños, T., & Girón-Pablo, S. (2014). Revisión de nemátodos entomopatógenos aislados en México. *Entomología Mexicana*, 1, 284-288.

Devine, G. J., Eza, D., Ogusuku, E., & Furlong, M. J. (2008). Uso de insecticidas: contexto y consecuencias ecológicas. *Revista peruana de medicina experimental y Salud Pública*, 25(1), 74-100.

Eisenback, J. D. (2002). Identification guides for the most common genera of plant-parasitic nematodes. Mactode Publications.

Fischer, P., & Führer, E. (1990). Effect of soil acidity on the entomophilic nematode *Steinernema kraussei* Steiner. *Biology and fertility of soils*, 9(2), 174-177.

García del Pino, F. (2008). Los Nemátodos entomopatógenos (Rhabditida: Steinernematidae y Heterorhabditidae) presentes en Cataluña y su utilización para el control biológico de insectos. Universitat Autònoma de Barcelona.

García-Caicedo, M., Torres, Á., & Ochoa, Á. (2013). Evaluación de nemátodos entomopatógenos para el control del picudo de la piña en el estado Táchira Venezuela. *Agronomía Tropical*, 63(1-2), 5-14.

Girón, P.S., Ruiz, V.J., Pérez, P.R., Sánchez, G.J.A. and Aquino, B.T. (2012). Isolation of entomopathogenic nematodes and control of *Phyllophaga vetula* Horn in Oaxaca, México. *African Journal of Biotechnology*. 11(99), pp. 16525-16531.

Giayetto, A. L., & Cichón, L. I. (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. Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 35(2), 163-183.

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

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

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

Grifaldo-Alcantara, P. F., Alatorre-Rosas, R., Segura-León, O., & Hernandez-Rosas, F. (2017). *Steinernema ralatorei* n. sp. 1 Isolated from Sugarcane Areas at Veracruz, Mexico. *Southwestern Entomologist*, 42(1), 171-190.

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

Griffin, C. T. (1993). Temperature responses of entomopathogenic nematodes: Implications for the success of biological control programmes. *Nematodes and the biological control of insect pests*, 115-126.

Griffin, C.T.; Chaerani, R.; Fallon, D.; Reid, A.; Downes, M.J. 2000. Occurrence and distribution of the entomopathogenic nematodes *Steinernema* spp. and *Heterorhabditis indica* in Indonesia. *J. Helminthol.*, 74: 143-150.

Hara, A. H., Gaugler, R., Kaya, H. K., & Lebeck, L. M. (1991). Natural populations of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae) from the Hawaiian Islands. *Environmental Entomology*, 20(1), 211-216. DOI: 10.1093/ee/20.1.211

Henrique de S Sabino, P., Moino Jr, A., Andaló, V., Lima, L. M., & Filgueiras, C. C. (2017). Efectos de los insecticidas sobre la liberación de CO<sub>2</sub> por nemátodos entomopatógenos (Nematoda: Rhabditida) y el desarrollo de sus bacterias mutualistas.

Hodda, M. (2011). "Phylum Nematoda Cobb 1932. In: Zhang, Z.-Q. (Ed.) Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness. Zootaxa, 3148(1), 63-95.

Hominick, W.M. 2002. Biogeography. En: GAUGLER, R. (Ed.) Entomopathogenic nematology, CAB International, New Jersey, USA, pp. 115-143.

Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (2019). Censo nacional agropecuario, INEGI, México.

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

Jarillo, A. M. (2001). Abundancia del complejo gallina ciega (Coleóptera: Melolonthidae) asociado al cultivo de maíz en el Centro de México. Agricultura Técnica en México, 27(2), 119-131.

Kanga, F. N., Waeyenberge, L., Hauser, S., & Moens, M. (2012). Distribution of entomopathogenic nematodes in Southern Cameroon. Journal of Invertebrate Pathology, 109(1), 41-51. DOI: 10.1016/j.jip.2011.09.008

Kary, N. E., Niknam, G., Griffin, C. T., Mohammadi, S. A., & Moghaddam, M. (2009). A survey of entomopathogenic nematodes of the families Steinernematidae and Heterorhabditidae (Nematoda: Rhabditida) in the north-west of Iran. *Nematology*, 11(1), 107-116.

Kaya, H. K. (1985). Entomogenous nematodes for insect control in IPM system. Biological control in agricultural IPM systems, 283-302.

Kaya, H. K., & Gaugler, R. (1993). Entomopathogenic nematodes. Annual review of entomology, 38(1), 181-206.

Klein, M. G. 1990. Efficacy against soil-inhabiting insect pest, pp. 195-210. En: Gaugler, R.; Kaya, H. K. (eds). Entomopathogenic nematodes in biological control. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Kung, S. P., Gaugler, R., & Kaya, H. K. (1990). Soil type and entomopathogenic nematode persistence. Journal of Invertebrate Pathology, 55(3), 401-406.

Leyva-Hernández, H. A., García-Gutiérrez, C., Ruíz-Vega, J., Calderón-Vázquez, C. L., Luna-González, A., & García-Salas, S. (2018). Evaluación de la Virulencia de *Steinernema riobrave* y *Rhabditis blumi* contra Larvas del Tercer Instar de *Spodoptera frugiperda*. Southwestern Entomologist, 43(1), 189-197.

Llano, R. A. L., & Giraldo, A. S. (2016). Aislamiento de nemátodos entomopatógenos nativos en cultivos de caña panelera y pruebas de patogenicidad sobre *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). Boletín Científico. Centro de Museos, 20(2), 114-123.

Luévano, M. S., Mejía, J. A., Herrera, A. L., Carrillo, H. V., Acuña, E. M., & de Estudios Nucleares, C. R. (2006). Nemátodos entomopatógenos (rhabditida: steinernematidae y heterorhabditidae) en el sur de Zacatecas.

Maciel-Vergara, G., Rodríguez-Hernández, A. I., & Chavarría-Hernández, N. (2010). Cultivo Monoxénico Sumergido del Nemátodo Entomopatógeno, *Steinernema carpocapsae* CABA01, en Biorreactor airlift con Recirculación Interna. *Instrucciones para autores* 6, 11.

Marimón, J. M., & Viza, A. L. (1995). Estudio de cuatro adaptaciones escolares de método de observación y determinación de la textura del suelo. *Enseñanza de las Ciencias de la Tierra*, 3(1), 35-39.

Maximiliano Orbegoso, M. A. (2014). Aislamiento y multiplicación de nematodos entomopatógenos en Trujillo–La Libertad.

Mráček, Z., Bečvář, S., Kindlmann, P., & Jersáková, J. (2005). Habitat preference for entomopathogenic nematodes, their insect hosts and new faunistic records for the Czech Republic. *Biological Control*, 34(1), 27-37. DOI:10.1016/j.biocontrol.2005.03.023

Merino, L., & France, A. (2009). Nemátodos entomopatógenos: Control biológico de insectos plaga de importancia económica. *Tierra Adentro*.

Meza-García, J. L., Elías-Santos, M., CortezMondaca, E., Guerrero-Olazarán, M., ViaderSalvadó, J. M., Luna-Olvera, H. A., Maldonado-Blanco, M. G., Quintero-Zapata, I. and Pereyra-Alfárez, B., (2014). Evaluation of *Heterorhabditis indica* (Rhabditida: Heterorhabditidae) Nematode Strain from Sinaloa, Mexico, Against *Bemisia tabaci* Immatures Under Laboratory Conditions. *Southwestern Entomologist*, 39, pp.727-738. <https://doi.org/10.3958/059.039.0404>.

Molina-Ochoa, J., Nguyen, K. B., González-Ramírez, M., Quintana-Moreno, M. G., Lezama-Gutiérrez, R., & Foster, J. E. (2009). *Steinernema diaprepesi* (Nematoda: Steinernematidae): its occurrence in western Mexico and susceptibility of engorged cattle ticks *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Florida Entomologist*, 92(4), 661-663.

Montoussé, A. P., Argibay, A. A., & Vázquez, J. P. M. (2008). Presencia de nemátodos entomopatógenos en suelos de castaño en Galicia. *Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales*, (26), 39-43.

Montores-Ramírez, J., Cortez-Madrigal, H., & Zepeda-Jazo, I. (2016). Presencia de nemátodos entomopatógenos *Steinernema Travassos*, 1927 y *Heterorhabditis Poinar*, 1976 en La Ciénega de Chapala, Michoacán, México. *Entomología Mexicana*, 3, 262-268.

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

Moo-Muñoz, A. J., Azorín-Vega, E. P., Ramírez-Durán, N., & Moreno-Pérez, M. P. (2020). Estado de la producción y consumo de plaguicidas en México.

Morón M. A. 2010. Diversidad y Distribución del Complejo “Gallina Ciega” (Coleoptera: Scarabaeoidea). En L.A. Rodríguez del bosque y M.A. Morón (eds.). Plagas del suelo. INIFAP. ISBN 978-607-7699-06-4. PP: 41-63.

Moscoso, R.P. y H. Cortés. M. 1995. Evaluación en laboratorio de *Euplectrus platypenae* (Hymenoptera heulophidae) como agente de biocontrol de “gusano cogollero” *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Mem. XXX Congreso Nac. Entomol. Chapingo, Edo. De México. pp. 36-37.

Navone, G. T., Achinelly, M. F., Notarnicola, J., & Zonta, M. L. (2017). Phylum Nematoda.

Nelson, D. W. and L. E. Sommers. 1996. Total carbon, organic carbon, and organic matter. Pp. 961–1010. In: Black, C. A. (Ed.) Methods of soil analysis. Part 3. Chemical methods. Soil Science of America and American Society of Agronomy, Madison, WI.

Nguyen, K. B., & Smart Jr, G. C. (1996). Identification of entomopathogenic nematodes in the Steinernematidae and Heterorhabditidae (Nemata: Rhabditida). Journal of nematology, 28(3), 286.

Nguyen KB, Shapiro-Ilan DI, Stuart RJ, Mccoy CW, James RR, Adams BJ (2004) Heterorhabditis mexicana n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Tamaulipas, Mexico, and morphological studies of the bursa of Heterorhabditis spp. Nematol 6:231–244

Nicholls, C. I. (2008). Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico (Vol. 2). Universidad de Antioquia.

Nicolás, H. C. (2011). Ventajas y desventajas de los insecticidas químicos y naturales. Universidad veracruzana. Facultad deficiencias químicas, 74.

Núñez, F. A., & Cordoví, R. A. (2004). Manual de técnicas básicas para el diagnóstico de las parasitosis intestinales. Editado por el Ministerio de Salud Pública de Cuba (MINSAP) y la UNICEF. Publicación Docente del IPK, Febrero del.

Orozco, R. A., Lee, M. M., & Stock, S. P. (2014). Soil sampling and isolation of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae, Heterorhabditidae). *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (89), e52083.

Özdemir, E., İnak, E., Evlice, E., & Laznik, Z. (2020). Compatibility of entomopathogenic nematodes with pesticides registered in vegetable crops under laboratory conditions. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 127, 529-535.

Parada Domínguez, O., Alatorre Rosas, R., Guzmán Franco, A. W., Hernández Rosas, F., Rojas Avelizapa, L. I., & Ruíz Vera, V. M. (2019). Effect of entomopathogenic nematodes on nymphs of *Aeneolamia albofasciata* and its persistence in sugarcane soils of Veracruz. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 10(SPE22), 115-127.

Peck, D. C. (2001). Diversidad y distribución geográfica del salivazo (Homoptera: Cercopidae) asociado con gramíneas en Colombia y Ecuador. *Revista Colombiana de Entomología*, 27, 129-136.

Perez, K. C. (2019). Aislamiento y caracterización de las bacterias simbiotes de los nemátodos entomopatógenos *heterorhabditoides chongmingensis*, *oscheius myriophila* y *caenorhabditis brenneri*.

Půža, V., & Mráček, Z. (2005). Seasonal dynamics of entomopathogenic nematodes of the genera *Steinernema* and *Heterorhabditis* as a response to abiotic factors and abundance of insect hosts. *Journal of Invertebrate Pathology*, 89(2), 116-122.

Rio, R. V., & Cameron, E. A. (2000). *Heterorhabditis bacteriophora*: seasonal dynamics and distribution in a stand of sugar maple, *Acer saccharum*. *Journal of invertebrate pathology*, 75(1), 36-40.

Rodríguez-Rebollar, H., Rojas, J. C., González-Hernández, H., Ortega-Arenas, L. D., Equihua-Martínez, A., Del Real-Laborde, J. I., & López-Collado, J. (2012). Evaluación de un cebo feromonal para la captura del picudo del agave (Coleoptera: Curculionidae). *Acta zoológica mexicana*, 28(1), 73-85.

Romero-Ramos, L. E., Isiordia-Aquino, N., Ruiz-Vega, J., Flores-Canales, R. J., Cortez-Isiordia, K. A., & Estrada-Virgen, M. O. (2020). Nemátodos entomopatógenos (Rhabditida: Steinernematidae) en suelos cañeros del centro de Nayarit, México.

Rosa, J.S.; Bonifassi, E.; Amaral, J.; Lacey, L.A.; Simoes, N.; Laumond, C. 2000. Natural occurrence of entomopathogenic nematodes (Rhabditidae: Steinernema, Heterorhabditis) in the Azores. *J. Nematol.*, 32: 215-222.

Rovesti, L., & Deseö, K. V. (1990). Compatibility of Chemical Pesticides with the Entomopathogenic Nematodes, *Steinernema Carpocapsae* Weiser and *S. feltiae* Filipjev (Nematoda: Steinernematidae). *Nematologica*, 36(1-4), 237-245.

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

Ryss, A. Y. (2017). A simple express technique to process nematodes for collection slide mounts. *Journal of nematology*, 49(1), 27.

Sandhi, R. K., Pothula, R., Pothula, S. K., Adams, B. J., & Reddy, G. V. (2020). First record of native entomopathogenic nematodes from Montana agroecosystems. *Journal of Nematology*, 52.

Sáenz, A. (2000). Ciclo de vida del nematodo entomopatógeno nativo *Steinernema feltiae*. *Agronomía Colombiana*. 21 (1-2): 48-53

Sáenz, A. (2005). Importancia de los nemátodos entomopatógenos para el control biológico de plagas en palma de aceite. *Revista Palmas*, 26(2), 41-57.

Sáenz, A., & López, J. C. (2011). Ciclo de vida y patogenicidad del aislamiento nativo *Heterorhabditis* sp. SL0708 (Rhabditida: Heterorhabditidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 37(1), 43-47.

Salgado-Morales, R., Rivera-Gómez, N., Martínez-Ocampo, F., Beltrán, L. F. L. A., Hernández-Mendoza, A., & Dantán-González, E. (2017). Draft genome sequence of *Photorhabdus luminescens* HIM3 isolated from an entomopathogenic nematode in agricultural soils. *Genome announcements*, 5(35).

Salgado-Morales, R., Martínez-Ocampo, F., Obregón-Barboza, V., Vilchis-Martínez, K., Jiménez-Pérez, A., & Dantán-González, E. (2019). Assessing the Pathogenicity of Two Bacteria Isolated from the Entomopathogenic Nematode *Heterorhabditis indica* against *Galleria mellonella* and Some Pest Insects. *Insects*, 10(3), 83.

Schulte, E. E., & Hopkins, B. G. (1996). Estimation of soil organic matter by weight loss-on-ignition. *Soil organic matter: Analysis and interpretation*, 46, 21-31.

Seenivasan, N., Prabhu, S., Makesh, S., & Sivakumar, M. (2012). Natural occurrence of entomopathogenic nematode species (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) in cotton fields of Tamil Nadu, India. *Journal of Natural History*, 46(45-46), 2829-2843. DOI: 10.1080/00222933.2012.727216

Siddiqi, M. R. (2000). *Tylenchida: parasites of plants and insects*. Tylenchida: parasites of plants and insects., (Ed. 2).

Silva-Díaz, H. (2018). Diferencias morfológicas relevantes para la identificación específica de larvas de uncinarias y *Strongyloides stercoralis*. *Revista Medica Herediana*, 29(4), 211-216.

Soler, D., L. Gómez y L. Sánchez. 2003. Formulación de nemátodos entomopatógenos. *Revista. Protección Vegetal*. 18(1):7-14.

Sotelo-Rivera, F. J., Alatorre-Rosas, R., López-Martínez, V., Villegas-Villareal, E. C., Carrillo-Benitez, M. G., & Mayorga-Reyes, L. (2017). Natural Occurrence of

Heterorhabditis indica Poinar, Karunakar & David<sup>1</sup> on Sugarcane Weevil, *Sphenophorus incurrens* Gyllenhal, at Morelos, Mexico. Southwestern Entomologist, 42(3), 905-910.

Soto Alvarez, V., & Santamarina Mijares, A. (1996). Demostración de la actividad biolarvicida de Romanomermis iyengari (Nematoda: Mermithidae) en condiciones de laboratorio. Kasmera, 179-90.

Shapiro-Ilan, D. I., D. H. Gouge, S. J. Piggott, and J. P. Fife. 2006. Application technology and environmental considerations for use of entomopathogenic nematodes in biological control. Biological Control 38:124-133.

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

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

Stock, S. P. (2015). Diversity, biology and evolutionary relationships. In Nematode pathogenesis of insects and other pests (pp. 3-27). Springer, Cham.

Ulu, T. C., Sadic, B., & Susurluk, I. A. (2016). Effects of different pesticides on virulence and mortality of some entomopathogenic nematodes. Invertebrate Survival Journal, 13(1), 111-115.

Vashisth, S., Chandel, Y. S., & Sharma, P. K. (2013). Entomopathogenic nematodes-a review. Agricultural Reviews, 34(3).

Vidaurre, D., Rodríguez, A., & Uribe, L. (2020). Factores edáficos y nemátodos entomopatógenos en un agroecosistema neotropical de banano. Revista de Biología Tropical, 68(1), 276-288.

Villanueva-Sánchez, E., Guzmán-Franco, A. W., Lomelí-Flores, J. R., Alatorre-Rosas, R., Ortiz-Solorio, C. A., Manuel-Pinto, V., & Villanueva-Verduzco, C. (2017). Susceptibility of *Bradysia difformis* 1 to Entomopathogenic Nematodes and their Persistence in Substrates Used for Poinsettia Production. *Southwestern Entomologist*, 42(4), 1015-1026.

Willis, H. H. (1921). A SIMPLE LEVITATION METHOD FOR THE DETECTION OF HOOKWORM OVA. *Medical Journal of Australia*, 2(18), 375-376.

Wharton, D.A. (1986). Life Cycle. In: *A Functional Biology of Nematodes*. Functional Biology Series. Springer, Boston, MA. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8516-9\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8516-9_6)

Womersley, C. Z. (1990). Dehydration survival and anhydrobiotic potential. In *Entomopathogenic nematodes in biological control* (pp. 117-137). CRC Press Boca Raton, FL.

Zaragoza-Ortega, M., Hernández-Cruz, J., Morón, M. Á., Valdez-Carrasco, J., Sánchez-Soto, S., & Segura-León, O. (2016). Phyllophaga en la Zona Cañera de Morelos, México. *Southwestern Entomologist*, 41(2), 453-468.

Zepeda-Jazo, I., Molina-Ochoa, J., Lezama-Gutiérrez, R., Skoda, S. R., & Foster, J. E. (2014). Survey of entomopathogenic nematodes from the families Steinernematidae and Heterorhabditidae (Nematoda: Rhabditida) in Colima, México. *International Journal of Tropical Insect Science*, 34(1), 53-57. DOI: 10.1017/S1742758413000416