



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

---

---

CIIDIR-IPN UNIDAD OAXACA  
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL DESARROLLO INTEGRAL  
REGIONAL

DOCTORADO EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y  
APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES

(PROTECCIÓN Y PRODUCCIÓN VEGETAL)

---

“AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE  
NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS PARA EL CONTROL DEL  
PICUDO DEL AGAVE (*Scyphophorus acupunctatus* Gyll.)”

---

**TESIS:**  
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

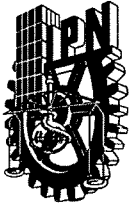
**PRESENTA:**  
JUAN REYES DELGADO GAMBOA

**DIRECTOR DE TESIS:**  
DR. JAIME RUIZ VEGA

Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, México  
Diciembre de 2015

---

---



# INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL SECRETARIA DE INVESTIGACION Y POSGRADO

## ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez siendo las 13:00 horas del día 7 del mes de Diciembre del 2015 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación del **Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca (CIIDIR-OAXACA)** para examinar la tesis de grado titulada: **“Aislamiento, caracterización y evaluación biológica de nematodos entomopatógenos nativos para el control del picudo del agave (*Scyphophorus acupunctatus* Gyll.)”**


Presentada por el alumno

<b>Delgado</b> Apellido paterno	<b>Gamboa</b> materno	<b>Juan Reyes</b> nombre(s)	Con registro:						
			B	1	1	0	9	5	1


aspirante al grado de: **DOCTORADO EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.


LA COMISION REVISORA  
Director de tesis

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Jaime Ruiz Vega

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Celirino Robles Pérez


  
\_\_\_\_\_  
Dr. José Antonio Sánchez García

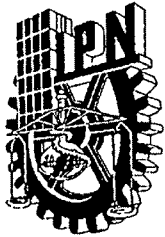
  
\_\_\_\_\_  
Dr. Alfonso Vásquez López

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Teodulfo Aquino Bolaños

EI PRESIDENTE DEL COLEGIO

  
\_\_\_\_\_  
Dr. José Rodolfo Martínez y Cárdenas

  
CENTRO INTERDISCIPLINARIO  
DE INVESTIGACION PARA EL  
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL  
C.I.I.D.I.R.  
UNIDAD OAXACA  
IPN.



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

*CARTA CESIÓN DE DERECHOS*

En la ciudad de Oaxaca de Juárez del día 07 del mes de diciembre de 2015, el (la) que suscribe **Delgado Gamboa Juan Reyes** alumno (a) del programa de **DOCTORADO EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES** con número de registro **B110951**, adscrito al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Dr. Jaime Ruiz Vega y cede los derechos del trabajo titulado: **“Aislamiento, caracterización y evaluación biológica de nemátodos entomopatógenos nativos para el control del picudo del agave (*Scyphophorus acupunctatus* Gyll.)”**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **Calle Hornos 1003, Col. Noche Buena, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca**, e-mail: [posgrado\\_oax@ipn.mx](mailto:posgrado_oax@ipn.mx) ó [juan\\_rdg@hotmail.com](mailto:juan_rdg@hotmail.com). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



CENTRO INTERDISCIPLINARIO  
DE INVESTIGACION PARA EL  
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL  
C.I.I.D.I.R.  
UNIDAD OAXACA  
I.P.N.

  
**DELGADO GAMBOA JUAN REYES**

*“Servirse de la ciencia y de la técnica con un profundo espíritu humanista; conducirlas, encauzarlas hacia el bienestar y la paz, es la tarea fundamental de nuestra época”*. Dr. Guillermo Haro Barraza.

## **DEDICATORIA**

A mis padres: Juan Delgado Delgado y Adela Gamboa García, por todo el apoyo que me han brindado a lo largo de la vida y porque con su ejemplo me han conducido por el camino de los valores y los principios.

A mi esposa Vero, por su amor y apoyo incondicional a lo largo de estos años, quien me ha acompañado en las alegrías y en los momentos difíciles cuando parecía que las cosas no salían, ahí estuvo y está siempre. A nuestra hija Mafalda Hypatía, que con su sonrisa y alegría me ha motivado durante esta importante etapa profesional en mi vida. Disculpen por todos los momentos de ausencia y el tiempo que no les he dedicado. Para ustedes dos, la dedicación especial de este trabajo.

A mi hermana Rosa Deyanira, de quien siempre he recibido cariño y respeto.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al pueblo de México, pues con parte de sus impuestos, le es posible al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) brindar el apoyo de becas de posgrado.

A la noble institución fundada por el Gral. Lázaro Cárdenas del Río, es decir, al Instituto Politécnico Nacional (IPN).

Al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR) IPN Unidad Oaxaca, por haberme dado la oportunidad de crecer profesionalmente.

Al Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV) Unidad Irapuato, Departamento de Biotecnología y Bioquímica, Laboratorio de Bioinsecticidas, por haberme brindado un lugar para llevar a cabo mi estancia de investigación.

Al Dr. Jaime Ruíz Vega por haber confiado en mí y permitirme llevar a cabo mi estancia de investigación, así como por el tiempo dedicado a la dirección de mi investigación.

Al Dr. Jorge E. Ibarra Rendón, por haberme aceptado para tomar el curso de Patología de insectos y realizar mi estancia de investigación bajo su asesoría en el laboratorio de Bioinsecticidas y por el tiempo dedicado.

Al Dr. Teodulfo Aquino Bolaños, por brindarme asesoría en laboratorio, acompañamiento a campo y por su amistad.

Al Dr. José Antonio Sánchez García por su revisión al escrito y orientación en los seminarios.

Al Dr. Celerino Robles Pérez por su orientación en los seminarios y revisión al escrito.

Al Dr. Sergio Girón Pablo por su asesoría en análisis estadístico de los resultados obtenidos.

A la M.C. Regina Basurto Ríos, por el apoyo brindado en el trabajo de laboratorio de Bioinsecticidas, por su amabilidad, orientación y amistad.

Al Ing. Manuel de Jesús Lorenzo Luis compañero y amigo, por su apoyo incondicional en los momentos de mayor trabajo.

Al Ing. Federico Gaytán Zárate compañero que mostró siempre disposición y apoyo al inicio del trabajo.

# CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS .....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	iv
RESUMEN .....	v
ABSTRACT .....	vi
I.- INTRODUCCIÓN .....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA .....	4
2.1.1 Origen y distribución geográfica.....	4
2.1.2 Hospedantes.....	4
2.1.3 Clasificación taxonómica.....	4
2.2 Descripción morfológica.....	4
2.2.1 Huevo.....	4
2.2.2 Larva .....	5
2.2.2 Pupa.....	5
2.2.3 Adulto.....	5
2.3 Biología .....	6
2.4 Daños.....	7
2.5 Control .....	7
2.5.1 Control químico .....	7
2.5.2 Control etológico .....	8
2.5.3 Control Cultural .....	8
2.5.4 Control biológico .....	8
2.6 Nemátodos entomopatógenos .....	9
2.6.1 Clasificación .....	10
2.7 Biología .....	11
2.7.1 Simbiosis nematodo-bacteria.....	12
2.7.2 Penetración e Infección.....	13
2.7.3 Comportamiento de los JI .....	14
2.8 Steinernematidae y Heterorhabditidae.....	15
2.9 Técnicas moleculares en la identificación de nemátodos entomopatógenos. .....	17

2.9.1 Espaciadores internos transcritos (ITS) .....	18
2.10 Endoterapia vegetal .....	18
2.11 Aplicación de nematodos mediante endoterapia vegetal .....	19
III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS .....	21
3.1 Objetivo general .....	21
3.2 Objetivos específicos .....	21
3.3 Hipótesis .....	21
IV. MATERIALES Y MÉTODOS .....	22
4.1 Área de estudio y sitio experimental .....	22
4.2 Cría de <i>Galleria mellonella</i> (L.).....	22
4.3 Recolección de las muestras .....	22
4.4 Aislamiento de los nemátodos entomopatógenos.....	23
4.5 Postulados de Koch´s .....	24
4.6 Multiplicación de nemátodos .....	24
4.7 Cuantificación de nemátodos .....	25
4.8 Caracterización molecular de los nemátodos aislados .....	26
4.9 Patogenicidad de los aislados contra larvas de <i>Scyphophorus acupunctatus</i> .....	27
4.10 Análisis estadístico.....	31
V. RESULTADOS.....	32
5.1 Aislamiento de nematodos entomopatógenos .....	32
5.2 Identificación Molecular.....	33
5.3 Patogenicidad de los aislados contra larvas de <i>Scyphophorus acupunctatus</i> .....	35
5.4 Aplicaciones en campo .....	38
VI. DISCUSIÓN .....	39
VII. CONCLUSIONES .....	44
VIII. LITERATURA CITADA.....	46
ANEXO 1.....	63
ANEXO 2.....	66



## INDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Lista de grupos taxonómicos de nemátodos parásitos y entomopatógenos.	10
Cuadro 2.	Tratamientos aplicados en el experimento (Bioensayo).	29
Cuadro 3.	Aislados de nemátodos procedentes de suelo en cultivos de <i>Agave angustifolia</i> Haw en diferentes localidades de Oaxaca, México.	32
Cuadro 4.	Secuencias de mayor alineación con las secuencias de los aislados de nemátodos entomopatógenos nativos en cultivos de <i>Agave angustifolia</i> Haw en Oaxaca, México.	34
Cuadro 5.	Análisis de varianza de mortalidad larval de <i>Scyphophorus acupunctatus</i> .	35
Cuadro 6.	Mortalidad de larvas de <i>S. acupunctatus</i> por nemátodos entomopatógenos en diferentes concentraciones, a las 72 horas de aplicados los tratamientos.	36
Cuadro 7.	Concentraciones letales (CL <sub>50</sub> y CL <sub>90</sub> ) y límites fiduciales (LF), para dos especies de nemátodos entomopatógenos aplicados a larvas de <i>S. acupunctatus</i> en condiciones de laboratorio.	37
Cuadro 8.	Tiempos letales (TL <sub>50</sub> y TL <sub>90</sub> ) y límites fiduciales (LF), para dos especies de nemátodos entomopatógenos aplicados a larvas de <i>Scyphophorus acupunctatus</i> en condiciones de laboratorio.	37

## INDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Dimorfismo sexual del adulto del picudo del agave. Vista lateral (A), vista dorsal (B) y diferenciación morfológica del último segmento abdominal (C). (Tomado de Rodríguez, 2011). 6
- Figura 2. Línea de tiempo mostrando el progreso de la infección por *S. carpocapsae* a 25°C (Lewis, 2002). 13
- Figura 3. Regiones del ADNr, utilizadas para la identificación de nematodos. Tomado de Sonnenberg, *et al.*, (2007). 18
- Figura 4. Producto de amplificación de PCR de la subunidad 28S de especímenes aislados en cultivos de *Agave angustifolia* Haw en Oaxaca, México. 1. *S. carpocapsae* All; 2. S. Juan Guelavía; 3. Cuilapam; 4. Zaachila; 5. Matatlán; M. Marcador de peso molecular 1Kb. 33
- Figura 5. Producto de amplificación de PCR de la región ITS de especímenes aislados en cultivos de *Agave angustifolia* Haw en Oaxaca, México. 1. *S. carpocapsae* All; 2. S. Juan Guelavía; 3. Cuilapam; 4. Zaachila; 5. Matatlán; M. Marcador de peso molecular 1Kb. 33

## RESUMEN

Los nemátodos entomopatógenos (NEPs) se consideran como agentes potenciales para el control de plagas en ambientes crípticos, encontrándose en diversidad de ambientes a través del mundo. El objetivo del presente estudio fue aislar nemátodos entomopatógenos nativos (NEPs) en campos cultivados con agave (*Agave angustifolia* Haw) en los Valles Centrales de Oaxaca y determinar su potencial en el control del picudo del agave (*Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal) (Coleoptera: Curculionidae). Se colectaron sesenta muestras de suelo (1000 g de suelo c/u) en el período de marzo a junio 2012. Se utilizó la técnica de insecto-trampa con larvas de *Galleria mellonella* (L.). Después de obtener cinco aislamientos, se comprobó la entomopatogenicidad de cuatro de éstos utilizando los postulados de Koch. Empleando secuenciación de los espaciadores internos transcritos (ITS) del ADN ribosomal (DNAr) y la subunidad 28S, fueron identificadas las especies *Steinernema websteri* (Cutler y Stock), *Steinernema carpocapsae* (Weiser) y *Metarhabditis (Rhabditis) rainai*. La eficacia de control de las cepas fue determinada con larvas de *S. acupunctatus* expuestas a concentraciones de 100, 500 y 1000 juveniles infectivos (JI) por mililitro en cajas de Petri. En ambas especies de nemátodos, las concentraciones que causaron las mayores mortalidades fueron 500 y 1000 JI por larva en un rango que varió de 85 a 100% de mortalidad bajo condiciones de laboratorio. Las Concentraciones Letales medias (CL<sub>50</sub>) fueron de 168 JI para *S. websteri* y 147 JI de *S. carpocapsae*, respectivamente, mientras que las CL<sub>90</sub> fueron de 890 y 3739 JI, en el mismo orden. Los ensayos en campo de aplicación de *Steinernema websteri* y *Steinernema carpocapsae* mediante aspersión y endoterapia no registraron mortalidad de larvas de *S. acupunctatus*, por lo cual se recomienda enfatizar la investigación sobre formulación y métodos de aplicación. Este estudio presenta el primer reporte de una cepa nativa de *S. websteri* en México, la cual es propuesta como agente de control biológico contra *S. acupunctatus*. Así mismo es el primer reporte de aislamiento para Oaxaca del nemátodo *Metarhabditis (Rhabditis) rainai* y el segundo en el país después del registrado en Guasave, Sinaloa.

**Palabras clave:** Nemátodos entomopatógenos, *Steinernema*, juveniles infectivos, control biológico, picudo del agave.

## ABSTRACT

Entomopathogenic nematodes (EPNs) are potential control agents for insect pests in cryptic habitats and are found in many environments worldwide. Native entomopathogenic nematodes were collected from March to June 2012 in soil from agave (*Agave angustifolia* Haw) fields in the Central Valleys of Oaxaca to evaluate potential for control of agave weevil, *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae). The technique of insect-baiting with larvae of *Galleria mellonella* (L.) was used. Using sequencing internal transcribed spacer regions of ribosomal DNA and the 28s or subunit, *Steinernema websteri* Cutler & Stock and *Steinernema carpocapsae* (Weiser) and *Metarhabditis (Rhabditis) rainai* nematodes were identified. The entomopathogenicity of the nematodes was verified by Koch's postulates. The efficacy of the strains at concentrations of 100, 500, and 1,000 infective juveniles (IJ's) per milliliter was tested on *S. acupunctatus* larvae in Petri dishes. Both nematode species at concentrations of 500 and 1,000 IJ's per larva killed 85-100% of agave weevils. The lethal mean concentrations (LC<sub>50</sub>) were 168 IJ's of *S. websteri* and 147 IJ's of *S. carpocapsae*, while the LC<sub>90</sub> values were 890 and 3,739 IJ's per larva, respectively. The bioassays in field of *S. websteri* and *S. carpocapsae* for spraying and endotherapy not recorded mortality, so it is recommended to emphasize research on formulation and application methods. This study is the first report of a native *S. websteri* strain in Mexico, which is proposed as a potential biological control agent against *S. acupunctatus*. Also is the first report of isolation of nematode *Metarhabditis (Rhabditis) rainai* in Oaxaca and the second of the country after the registration in Guasave, Sinaloa.

**Keys words:** Entomopathogenic nematodes, *Steinernema*, infective juveniles, biological control, agave weevil.

## I.- INTRODUCCIÓN

La familia agavaceae está integrada por ocho géneros, entre los cuales se encuentra el género agave; en el continente americano se encuentran 310 especies descritas y México cuenta con 272 especies, de las cuales 151 son endémicas. Por esta razón se considera a México como el centro de origen, diversificación y evolución de las especies de agave (Granados, 1999).

Las agaváceas se hallan desde el nivel del mar hasta los 3,300 msnm sin embargo, su abundancia es mayor entre los 800 y 2,500 msnm (SAGARPA *et al.*, 2004).

En Oaxaca, México la superficie georreferenciada cultivada con agave, asciende a un total de 8,422.7 hectáreas; los distritos de Tlacolula (54.4%) y Yautepec (27.1%) concentran el 81.5 % del total en tanto que los demás distritos solo representan el 18.5 % (Fundación Produce Oaxaca, 2008). La producción de mezcal es una actividad de gran importancia económica y social que se ve afectada por una gama de problemas ambientales y biológicos, dentro de éstas sobresalen la incidencia de enfermedades y plagas entre las que destaca el ataque del picudo de agave, que ocasiona daños severos a la planta de maguey (COMMAC, 2004).

El picudo del agave (*Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal) es la principal plaga del agave pulquero (*Agave atrovirens* Kart), agave tequilero (*Agave tequilana* Weber) y agave mezcalero (*Agave angustifolia* Haw) (Halffter, 1957).

Las larvas de este insecto barrenan la parte basal de las hojas, lo que ocasiona la pudrición y muerte de la planta, el picudo de agave en fase adulta generalmente está asociado con microorganismos, entre las que se incluyen algunos hongos y bacterias (Fucikovsky, 1999), además el adultos puede ser un vector natural de la bacteria *Erwinia carotovora* Dye en agave (Rodríguez, 1999).

Uno de los principales problemas para el manejo de este insecto es que todo su ciclo biológico lo realiza en el interior de la planta, es decir, es de tipo críptico.

El combate de los picudos se dificulta debido a distintos factores. Los adultos machos producen una feromona que atrae a las hembras y machos. Una vez fecundadas, las hembras depositan sus huevecillos en un orificio que cavan en el tallo central de la planta; la nueva generación de adultos emerge después de aproximadamente 135 días (Solís-Aguilar *et al.*, 2001). Todos los estadios larvarios coexisten en la parte central, donde cavan galerías y propagan la bacteria y se alimentan del tejido en descomposición. Después de 60-80 días las larvas abandonan la planta y pupan en el suelo. Otra complicación la representa el que las plantas requieren de 7-8 años para alcanzar la madurez, por lo que se requiere manejar la plaga por varios años.

A pesar de que estas condiciones complican el manejo de la plaga, también proporcionan condiciones para la utilización de nematodos entomopatógenos para su control, ya que éstos son más efectivos en ambientes crípticos y han sido utilizados exitosamente contra varias especies de picudos (Shapiro-Ilan *et al.* 2004). Estos nematodos se podrían aplicar para reducir las poblaciones de larvas y pupas, ya que varios aspectos de su ciclo de vida los hacen candidatos ideales para el control de los picudos.

Los NEP han sido utilizados exitosamente para el control de especies relacionadas, incluyendo el picudo de los cítricos *Diaprepes abbreviatus*, picudo del nogal *Curculio caryae*, picudo negro de la vid *Otiorhynchus sulcatus* (Grewal *et al.* 2005) y picudo grande del pino *Hylobius abietis* (Dillon *et al.*, 2006), entre otros.

Además, 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 NEP actualmente tiende a usar preferentemente especies de NEP endémicos de las zonas geográficas donde éstos serían aplicados para el biocontrol (Campos-Herrera *et al.*, 2007), 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 NEP es frecuentemente más eficaz que el correspondiente a especies exóticas, cuando los especímenes han sido aplicados en igualdad de circunstancias (Campos-Herrera *et al.*, 2007).

No obstante la importancia que tiene *S. acupunctatus* en las plantaciones de Agave en Oaxaca, los métodos de control biológico usando nematodos entomopatógenos han sido poco estudiados.

Por consiguiente, es necesario aislar y caracterizar nematodos entomopatógenos nativos adaptados localmente que se evalúen biológicamente contra el picudo del agave.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1.1 Origen y distribución geográfica

Esta plaga es originaria de América, del suroeste de Estados Unidos, Baja California, México. Actualmente se encuentra en países de Asia, África, Europa y Oceanía (CAB International, 2011). En México se tienen registros de su presencia en los estado donde se cultivan las diferentes especies de *Agave* (González *et al.*, 2007).

### 2.1.2 Hospedantes

El picudo del agave tiene preferencia por especies de agave como el henequén (*Agave fourcroydes*), el maguey pulquero (*A. atrovirens*), el agave tequilero (*A. tequilana* var. Azul), el agave mezcalero (*A. angustifolia*). También se le ha encontrado en otros géneros y especies de plantas como el nardo (*Polianthes tuberosa*) y (*Yucca valida*) (Camino *et al.*, 2002; Servín *et al.*, 2006; González *et al.*, 2007; Velázquez *et al.*, 2006). Se considera la plaga más significativa de agaves cultivados del mundo (Ruíz-Montiel *et al.*, 2009).

### 2.1.3 Clasificación taxonómica

El picudo del agave pertenece al phylum: Arthropoda, clase: Insecta, orden: Coleoptera, familia: Dryophthoridae, género: *Scyphophorus*, y especie: *acupunctatus* Gyllenhal (CAB International, 2011)

## 2.2 Descripción morfológica

### 2.2.1 Huevo

Los huevos del picudo del agave son de color blanco-perla de forma ovoide-alargada, con una longitud de 1.3 a 1.7 mm y diámetro de 0.50 a 0.60 mm, con corion suave y delgado, a medida que van madurando van tomando un tono amarillento (Solís, 2001).



### **2.2.2 Larva**

Las larvas son de color blanco-lechoso y apodas, presentan cuerpo curvado y arrugado. El último segmento abdominal presenta dos procesos carnosos, cada uno con tres setas, de las cuales dos están en posición central. Las larvas completamente desarrolladas miden 18 mm de largo por 4 mm de ancho, con cabeza dura y mandíbulas fuertes (Solís, 2001).

### **2.2.2 Pupa**

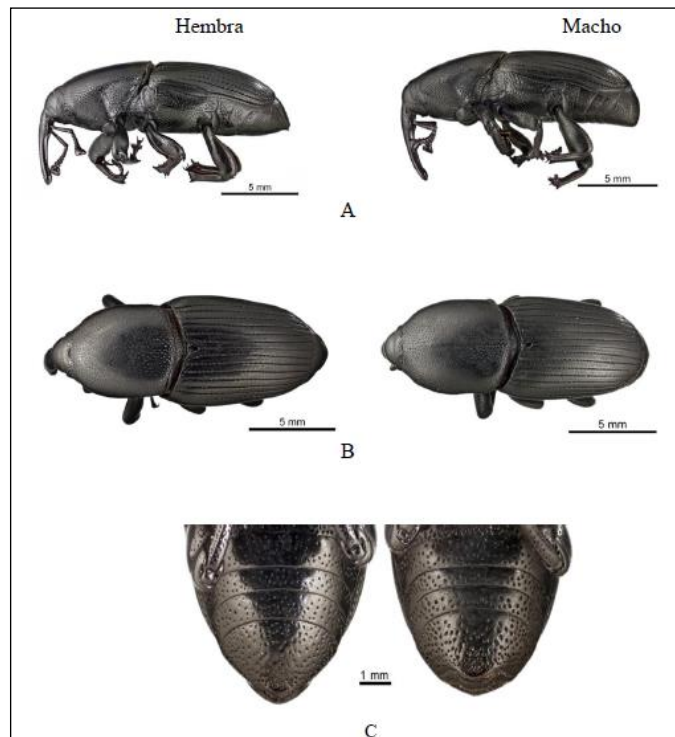
La pupa es de tipo exarata, miden en promedio 16 mm de largo, de color amarillo cafésoso al principio, pero después, la cabeza y otras partes adquieren una coloración más oscura, hasta que la pupa se torna de un color café muy oscuro, casi negro. Los paquetes alares, patas y pico se ven a los lados y bajo la superficie del cuerpo (Solís, 2001).

### **2.2.3 Adulto**

Los adultos son de color negro, miden de 12 a 15 mm en promedio, con una fina puntuación en todo el cuerpo; sus élitros son estriados y sin pubescencias; pico casi recto, funículo antenal de seis segmentos, el mazo antenal no visible lateralmente; el escutelo es pequeño y ápice de los élitros truncados; la fórmula tarsal 5-5-5, con el tercer segmento bilobulado, y el último tarso con uñas simples. Abdomen compuesto por 10 segmentos, aunque ventralmente solo cinco segmentos (esternitos) son visibles, dorsalmente son visibles ocho (terguitos), el resto de los segmentos se encuentran plegados dentro del cuerpo y modificados en los órganos de reproducción (Figura 1.3a y b). Las hembras ovipositan cuatro huevos por mes y de 25 a 30 durante su vida (Ruíz *et al.*, 2008).

El sexo de los adultos se diferencia morfológicamente en el último segmento abdominal en vista ventral, en la hembra es angosto y puntiagudo y en el macho es truncado y romo. La abertura de la genitalia en el macho es en forma

de media luna; mientras que en la hembra es en forma de ranura para la recepción del edeago (Figura 1.3c) (Rodríguez, 2011).



**Figura 1.** Dimorfismo sexual del adulto del picudo del agave. Vista lateral (A), vista dorsal (B) y diferenciación morfológica del último segmento abdominal (C). (Tomado de Rodríguez, 2011).

### 2.3 Biología

El periodo de incubación varía de 3 a 7 días. El ciclo biológico del picudo del agave desde huevo hasta adulto es de 81 días, aunque puede variar en función del medio ambiente y los factores nutricionales (Ramírez-Choza, 1993). Los estados de prepupa y pupa se completan entre los 3-10 y 12-16 días, respectivamente (González *et al.*, 2007). De acuerdo con Bravo (2003) en Oaxaca, dada la diversidad de ambientes que existen, se estimó que para localidades representativas y con condiciones ambientales diferentes, el número de generaciones del picudo de agave en un año varía de 1.4 a 2.6, dependiendo de las condiciones ambientales.

## **2.4 Daños**

Los daños de este insecto son provocados por larvas en todos sus instares, debido a que barrenan las piñas mientras que los adultos se encuentran entre la base de las hojas, en el cogollo, en la raíz principal y en infestaciones severas invaden el escapo floral (Aquino *et al.*, 2007). Sánchez-Peña (2001) reporta a *S. acupunctatus* como vector de la bacteria *Erwinia carotovora* en *A. tequilana*. Solís-Aguilar *et al.*, (2001) encontraron en todas las plantas con síntomas de pudrición del cogollo, presencia de adultos y larvas de *S. acupunctatus*, al evaluar la relación entre plantas afectadas por este síntoma y la infestación con picudo en campo. El adulto es activo durante todos los meses del año (Ramírez, 1993); sin embargo, durante los meses de febrero a julio se presentan los picos de máxima actividad, un poco antes del periodo de lluvias (Solís, 2001).

Solís y colaboradores (2001), reportan pérdidas significativas en las plantaciones comerciales de *Agave tequilana* Weber y henequén (*A. fourcroyd* Lemaire). En esta última especie, se han reportado pérdidas del 40% en el rendimiento en el norte de Yucatán (Valdés *et al.*, 2004).

Bravo (2003) reporta pérdidas entre 1,4-26%, mientras que Aquino y colaboradores (2005) reportan pérdidas que van de 14,4-46,4% en cultivos de agave espadín (*A. angustifolia* Haw) en los valles del estado de Oaxaca.

## **2.5 Control**

### **2.5.1 Control químico**

El control del picudo del agave con insecticidas es complicado, ya que los adultos, larvas y pupas se encuentran dentro de la “piña”, sin embargo, cuando se detectan picudos alimentándose sobre una o varias plantas dañadas en el cogollo, pueden hacerse aplicaciones de insecticidas de contacto ligeramente tóxicos, para reducir las poblaciones del insecto (Pérez y Rubio, 2007).

### **2.5.2 Control etológico**

Aquí se incluye el uso de semioquímicos, trampas con feromona, kairomona, repelentes, alomonas, disuasivos de la alimentación y otras sustancias que modifican el comportamiento del insecto (Azuara-Dominguez, 2013).

### **2.5.3 Control Cultural**

Es recomendable que los productores al detectar plantas con pudrición del cogollo avanzada y que son altamente atractivas para los picudos adultos, las eliminen quemándolas, como una medida fitosanitaria para reducir las poblaciones del picudo del agave y la dispersión de la enfermedad (González *et al.*, 2007).

### **2.5.4 Control biológico**

Dentro de los enemigos naturales del picudo del agave se encuentran los depredadores de larvas como *Hololepta* spp. (Coleoptera: Histeridae), *Placodes ebeninus* Lewis, *Lioderma yucateca* Marseul y *L. cacti* Marseul. Mientras que en el caso de parasitoides se menciona a *Alienoclypeus insolitus* Shenefelt (Hymenoptera: Braconidae) (Lock, 1969). Para el control de adultos se recomiendan los hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Verticillium* spp., y los nematodos entomopatógenos *Steinernema* spp., *Steirnema feltiae* cepa California y de *Heterorhabditis indica* (Rhabditida: Heterorhabditidae (Álvarez, 2000; Pacheco, 2002; Espinosa *et al.*, 2005; Aquino *et al.*, 2006; González *et al.*, 2007).

Una alternativa es utilizar el control biológico haciendo uso de parasitoides, depredadores y patógenos (Rodríguez-Del Bosque, 2012). Una parte importante dentro de éste, la constituye el control microbiano, en donde el uso de nemátodos entomopatógenos (NEPs) en el manejo de plagas ha cobrado importancia en años recientes (Lacey *et al.*, 2001).

## 2.6 Nemátodos entomopatógenos

Los nemátodos entomopatógenos o entomofílicos comprenden especies que tienen afinidad con insectos (Stock, 2002). Sin embargo, no fue hasta 1930 en que se consideró la posibilidad de usar nematodos para el control de *Popillia japonica* (Coleóptera:Scarabidae).

Los nemátodos entomopatógenos poseen cuerpo elongado y cilíndrico, tienen una longitud que va desde 0.1 a 8 mm (Alatorre, 2012), mientras la longitud de los juveniles infectivos va de un rango de 440-1500  $\mu\text{m}$ , son no segmentados, con sistema excretor, nervioso, digestivo, reproductivo y muscular, carecen de sistema circulatorio y respiratorio (Kaya y Stock, 1997). El tracto alimenticio inicia a partir de la boca, seguida de una cavidad bucal o estoma, esófago, intestino, recto y ano (Kaya y Stock, 1997).

Los sexos están separados. El sistema reproductivo del macho se inicia ventralmente dentro del recto formando la cloaca, tiene uno o dos testículos y poseen espículas esclerosadas utilizadas como una estructura de copulación, estas pueden o no ser guiadas por otras estructuras denominadas gobernáculos. Las hembras tienen uno o dos ovarios y la vulva localizada ventralmente cerca de la mitad del cuerpo o más cargada hacia la parte posterior (Kaya y Stock, 1997). A los estados inmaduros es difícil determinarles el sexo debido a que no se les detectan estructuras genitales aparentes.

Los nemátodos del género *Steinernema* y *Heterorhabditis* han surgido como excelentes candidatos de biocontrol, ya que son reconocidos con potencial para el manejo de insectos con hábitat críptico como barrenadores y algunas plagas edafícolas o que presentan una fase de desarrollo en el suelo (Gaugler, 2002; Alatorre, 2012). Los NEPs de las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae presentan una asociación simbiótica con bacterias específicas del género *Xenorhabdus* y *Photorhabdus*, respectivamente, ubicadas en el intestino de los infectivos juveniles (JI).

### 2.6.1 Clasificación

Los nemátodos pertenecen al reino Animalia, dentro del clado Ecdysozoa, o animales que mudan (Aguinaldo *et al.*, 1997). Dentro del phylum Nematoda, se conocen 30 familias asociados a insectos (Stock y Hunt, 2005), siete de estas familias contienen especies que tienen potencial para el control biológico de insectos: Mermithidae (Orden: Mermithida), Allantonematidae, Neotylenchidae, Rhabditidae, Diplogasteridae, Heterorhabditidae y Steinernematidae (Orden: Rhabditida) (Stock y Goodrich-Blair, 2012).

**Cuadro 1.** Lista de grupos taxonómicos de nemátodos parásitos y entomopatógenos.

Clase	Orden	Familia
ENOPLEA	Mermithida	Mermithidae
CHROMADOREA	Rhabditida	Steinernematidae
		Allantonematidae
		Neotylenchidae
		Rhabditidae
		Diplogasteridae
		Heterorhabditidae

Tomado y modificado de Stock y Goodrich-Blair, (2012).

Dentro de la familia Steinernematidae *Steinernema* es el género aceptado y en Heterorhabditidae es *Heterorhabditis* (Kaya *et al.*, 1993).

Los NEPs pertenecen al phylum: Nematoda, clase: Secernentea, orden: Rhabditida, familia: Steinernematidae y Heterorhabditidae, género: *Steinernema* y *Heterorhabditis* (Stock y Hunt, 2005).

## 2.7 Biología

Los nemátodos entomopatógenos tienen un ciclo de vida, que presenta seis estados: huevo, cuatro estadios juveniles (J1, J2, J3, J4), y adultos. El huevo embrionado eclosiona en un primer juvenil (J1) que se mantiene dentro de la cubierta del huevo. El primer juvenil muda y desarrolla dentro de un segundo juvenil (J2) que se mantiene en el huevo. El segundo estado juvenil bien desarrollado perfora la cubierta del huevo y eclosiona, se alimenta y continúa su desarrollo, mudando eventualmente en tercer estadio (J3). El tercer estadio continúa su desarrollo, mudando a cuarto instar (J4) y esta muda finalmente al estado adulto (♂, ♀) (Alatorre, 2012).

Los NEPs producen formas resistentes, las cuales se designan como juveniles resistentes, juveniles infectivos (J1 ó J3) (dauer). Las formas juveniles resistentes son el tercer estadio de desarrollo del nematodo, estas formas usualmente se encuentran cubiertas por la cutícula del segundo estadio. Este lleva las células de la bacteria simbiote (alrededor de 200) dentro de una porción ventricular del intestino o en el lumen faringeal (Lewis, 2002).

Dicho ciclo puede proceder por dos rutas; a) si los nutrientes suministrados son suficientes y la población no presenta un hacinamiento, los juveniles infecciosos se desarrollan hasta llegar a machos y hembras adultas de la primera generación (Alatorre, 2012).

Los huevos de estas hembras adultas eclosionan y los J1 se desarrollan a través de cada estado de vida, hasta formar poblaciones amfimicticas (machos y hembras) adultas de segunda generación. Este ciclo de vida tarda de 8 a 10 días a 24 °C (ciclo largo). b) si los nutrientes son insuficientes o existe un hacinamiento en la población, los J1 se desarrollan hasta llegar a ser machos y hembras adultos de la primera generación y los huevos producidos por las hembras dan origen directamente a juveniles infecciosos, este ciclo tarda de 6 a 7 días (ciclo corto) (Alatorre, 2012).

Los ciclos de vida dependen de la temperatura y no se completa a temperaturas inferiores de 10 o 15 °C o a temperaturas superiores de 35 a 37°C, siendo la óptima de 24 °C (Alatorre, 2012).

### **2.7.1 Simbiosis nematodo-bacteria**

Los NEP de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis*, están asociados simbióticamente con bacterias patógenas de insectos pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, así *Heterorhabditis* está asociado con bacterias del género *Photorhabdus* y *Steinernema* con *Xenorhabdus* (Montesinos, 2003).

Las bacterias simbiontes se encuentran ubicadas en una vesícula especial en el intestino de los juveniles infectivos de las especies del género *Steinernema* (*Xenorhabdus* spp.) y a lo largo del intestino completo y la faringe de los juveniles infectivos de especies del género *Heterorhabditis* (*Photorhabdus luminescens*) (Peteira, et al., 2008).

Los nemátodos se reproducen en el cadáver, alimentándose de la biomasa producida por la bacteria y de los tejidos del insecto que ha metabolizado la bacteria. Cuando los JI escapan del cadáver del insecto, portan ya las células de la bacteria en su interior, asegurando la persistencia de la asociación simbiótica entre ambos organismos a través de generaciones (Peteira, et al., 2008).

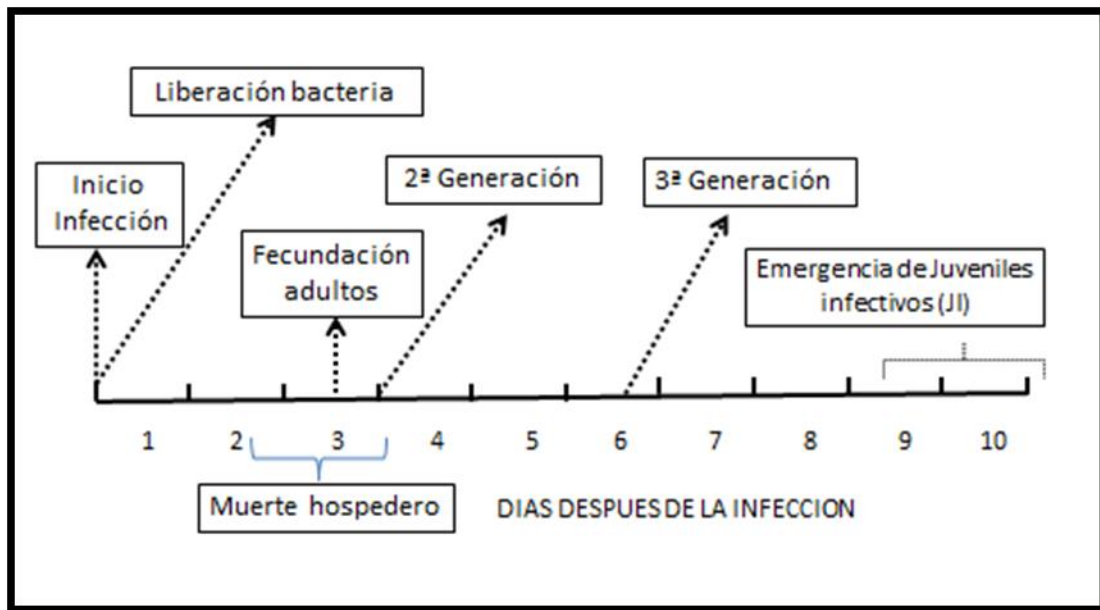
Los JI no se alimentan fuera del insecto, sin embargo pueden vivir varias semanas de las sustancias que tienen almacenadas como lípidos, o permanecer latentes por varios meses al entrar en estado cercano al anhidrobiótico (Grewal, 2000).

Este mutualismo simbiótico nematodo-bacteria es altamente específico, tanto que las especies de nemátodos no pueden re-asociarse con especies de bacterias no nativas (Stock et al., 2001; Emelianoff et al. 2008).



## 2.7.2 Penetración e Infección

Después de localizar a su hospedero susceptible el JI penetra a través de las aberturas naturales (boca, ano, espiráculos, membranas intersegmentales) y alcanza al hemocele (Lewis *et al.*, 2006). Los JI liberan la bacteria, la cual causa una septicemia letal, usualmente dentro de 24-48 horas (Figura 2) (Mekete *et al.*, 2005). Las células bacterianas producen compuestos antimicrobianos que inhiben el crecimiento de una amplia gama de microorganismos (Peteira, *et al.*, 2008).



**Figura 2.** Línea de tiempo mostrando el progreso de la infección por *S. carpocapsae* a 25°C (Lewis, 2002).

Los nemátodos se alimentan de la bacteria y del cadáver en descomposición del insecto, se reproducen por 2-3 generaciones dentro del cadáver completando su desarrollo y emergen como juveniles de tercer estadio (J1 ó J3), dispersándose dentro del suelo en búsqueda de nuevos hospederos (Adams y Nguyen, 2002).

De manera alternativa los nemátodos pueden penetrar el sistema traqueal a través de los espiráculos. En larvas de mosca sierra (Hymenoptera: Diprionidae), los espiráculos son la ruta más importante de entrada para *S. carpocapsae*

(Alatorre, 2013). Otras especies de insectos, sin embargo, excluyen a los invasores del sistema traqueal por la presencia de placas espiraculares, como en el caso de las gallinas ciegas y larvas de mosca (Alatorre, 2013).

Otro sitio de penetración utilizado por los nemátodos entomopatógenos es el tegumento o las membranas intersegmentales. Después de penetrar exitosamente, los JI se encuentran en el hemocele, en donde se enfrentan al sistema inmune del hospedero. Los nemátodos pueden resistir la respuesta del insecto hospedero (encapsulación, melanización) mediante infecciones múltiples (Dowds y Peters, 2002). El periodo transcurrido desde la invasión del nemátodo a la liberación de la bacteria es crucial para evitar la respuesta de encapsulación (Alatorre, 2013).

Se ha demostrado que al introducir la bacteria simbiote al hemocele, mediante inyección intrahemocilica en larvas de *Galleria mellonella*, la bacteria es igualmente patógena, que al ser introducida por el nematodo, por lo que se dice que el nematodo actúa como vector o jeringa (Alatorre, 2013).

### **2.7.3 Comportamiento de los JI**

Los nemátodos entomopatógenos pueden comportarse como emboscadores (ambusher), que están en espera del paso por la superficie del suelo de un insecto hospedero o hasta que un hospedero favorable entre en su hábitat (Grewal *et al.*, 2001). Otro grupo es denominado buscador (cruiser), en donde los JI pueden buscar activamente a su hospedero, son móviles, desplazándose en el suelo de manera horizontal y vertical, en respuesta a las señales químicas del hospedero (gradientes bacterianos, heces fecales, dióxido de carbono), habilidad que les permite encontrar a sus hospederos (Grewal *et al.*, 2001).

Los JI pueden mantenerse parados sobre su cola, moviéndose de un lado a otro (nictación) o inclinándose para saltar (jumping) como mecanismo para atacar a su hospedero. La frecuencia de salto varía entre las especies de *Steinernema*, pero no se ha reportado en *Heterorhabditis*. El salto se inicia cuando el nemátodo está parado sobre su cola y dobla rápidamente su región anterior de su cuerpo, hasta que la cabeza haga contacto con la región ventral de su cuerpo y en esa posición toma el impulso para saltar.

La fuerza generada por este mecanismo es suficiente para impulsarse un promedio de  $4.8 + 0.8$  mm (nueve veces la longitud del nemátodo). El comportamiento de estar parados y saltar se correlacionan con los nemátodos emboscadores (Campbell y Kaya, 2000). Los nemátodos con comportamiento de buscadores tienden a ser más largos en tamaño que los emboscadores (Campbell y Kaya, 2002).

Los emboscadores se asocian principalmente a las primeras capas del suelo y los buscadores con perfiles más profundos (Campbell *et al.*, 1996). Así, especies de *Steinernema* se localizan en suelo a profundidades menores de 15 cm, mientras que especies de *Heterorhabditis* se encuentran en el suelo a profundidades hasta de 35 cm.

## **2.8 Steinernematidae y Heterorhabditidae**

Los nemátodos dentro del género *Steinernema* (Travassos, 1927) (Steinernematidae) constituyen una promesa como agentes de control biológico debido a su alta virulencia y amplio rango de hospederos (Stock *et al.*, 2001). Los cadáveres de insectos infectados por nemátodos steinernemátidos presentan una coloración ocre, amarillo-marrón o negro (Kaya y Stock, 1997).

Las especies de *Steinernema* están distribuidas ampliamente por el mundo y los aislados muestran diferencias en el comportamiento, rango de huéspedes, infectividad y tolerancias ambientales; esta variabilidad ha estimulado el interés en

encontrar nuevas cepas y especies potencialmente útiles para el control biológico (Stock *et al.*, 2001).

Los steinernematidos presentan una reproducción sexual al existir desde su maduración, individuos hembras y machos, por lo cual todas las generaciones son amfimíticas, lo cual favorece una mayor diversidad genética y especiación (Hominick *et al.*, 1996), con excepción de *S. hermafroditum*, hermafrodita en la primera generación (Stock *et al.*, 2004).

Actualmente, *Steinernema* comprende 40 especies descritas (López-Núñez *et al.*, 2007). Estos hallazgos sugieren que *Steinernema* se encuentra más ampliamente distribuido en los suelos que *Heterorhabditis* (Peteira, *et al.*, 2008).

La familia Heterorhabditidae contiene a los nemátodos entomopatógenos del género *Heterorhabditis*, que se caracterizan por vivir en asociación simbiótica con bacterias de la familia Enterobacteriaceae, del género *Photorhabdus*, que llevan en su intestino (Kaya y Gaugler, 1993).

Los *Heterorhabditis* penetran en el huésped por aberturas naturales (boca, ano o espiráculos) y también pueden penetrar directamente a través de la cutícula (Lewis y Clarke, 2012). La infección en insectos por nemátodos *Heterorhabditis* provoca coloración rojo-ladrillo, púrpura anaranjado y algunas veces verdosa, con luminiscencia en la oscuridad (Kaya y Stock, 1997).

El ciclo de vida se completa dentro del mismo hospedero y la primera generación de adultos son hermafroditas en la primera generación pero amfimíticas (hembras y machos) en la siguiente generación (Lewis y Clarke, 2012).

De acuerdo con Alatorre (1999), esta familia fue creada con *Heterorhabditis bacteriophora*. El género tiene pocas especies (17), todas ellas asociadas mutualísticamente a la bacteria *Photorhabdus luminescens* (Lewis y Clarke, 2012).

## **2.9 Técnicas moleculares en la identificación de nematodos entomopatógenos**

Hasta antes de la década de los 90, la descripción de los nemátodos se fundamentaba principalmente en caracteres morfológicos y morfométricos. Sin embargo, con el advenimiento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la secuenciación del DNA, han revolucionado la genética y la taxonomía de los nemátodos no solo por su utilidad en los propósitos de diagnóstico, también porque son poderosas herramientas para interpretar las relaciones filogenéticas en diferentes niveles taxonómicos (Stock, 2002).

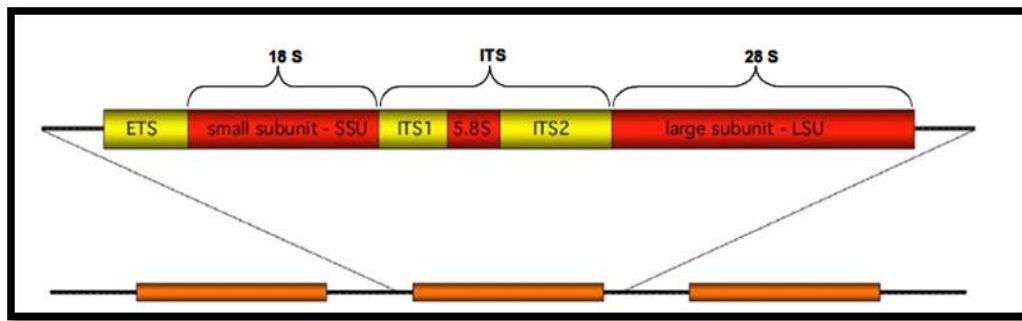
Actualmente, debido a la dificultad de interpretar los caracteres morfológicos, a la reducción de expertos en taxonomía y a la aparición de nuevas herramientas para identificación, se utilizan una combinación de métodos que incluyen la morfología y análisis de perfiles de ADN (Hominick, 2002).

Los métodos basados en el análisis del ADN han sido utilizados para diversos propósitos, entre estos se encuentran los estudios de variación genética, para identificar y caracterizar especies. Una de las mayores ventajas de estos métodos, es que utilizan la información genética directamente y no de productos secundarios como proteínas. Los estudios ínter específicos en nemátodos, tanto sobre el código de barras de ADN como la filogenia del grupo, han utilizado principalmente fragmentos/regiones de los genes 18S y 28S del ADNr nuclear, los cuales son genes de copias múltiples que se presentan en repeticiones en tándem separadas por espacios intergénicos (Stock y Goodrich-Blair, 2012).

### 2.9.1 Espaciadores internos transcritos (ITS)

Las secuencias de los espaciadores internos transcritos ribosomales (ITS-1 e ITS-2) (figura 3) representan uno de los loci nucleares más variables y, debido a la disponibilidad de cebadores universales que funcionan con la mayoría de los nematodos, su uso se ha generalizado (Blouin, 2002).

La región ITS del ADN ribosomal nuclear parece ser un marcador confiable para la identificación de especies dentro de cada género de nemátodos entomopatógenos (Kuwata *et al.*, 2006). De Ley *et al.* (2005) indica que trabajar con la subunidad 28S (región grande -LSU- del ADNr) en nemátodos, proporciona sitios relativamente conservados en todos los clados de nemátodos.



**Figura 3.** Regiones del ADNr, utilizadas para la identificación de nematodos. Tomado de Sonnenberg, *et al.*, (2007).

### 2.10 Endoterapia vegetal

En la búsqueda de nuevas alternativas de control de plagas y enfermedades, que sean sustentables, han surgido los sistemas de inyección de insecticidas (Franco-Islas, 2001).

El uso de insecticidas es una alternativa para el control de insectos plaga, y estos pueden ser aplicados mediante inyecciones. Rivas, (1996) define a los sistemas de inyección de insecticidas como un método por el cual se pueden aplicar productos químicos directamente al tronco, para que de esta manera sean translocados por el sistema fisiológico interno del árbol y puedan llegar a las raíces

y el follaje. Por medio de esta técnica se pueden aplicar también otro tipo de productos como fertilizantes y reguladores de crecimiento (Franco-Islas, 2001).

Franco-Islas, (2001) menciona que “En México, se han llevado a cabo pruebas con inyecciones de Furadán (carbofurán) desde 1988 para tratar árboles de pirul atacados por la escama *Calophya rubra*”.

Franco-Islas, (2001) empleó los insecticidas Imidacloprid y Monocrotofos en el control de los descortezadores *Phloeosinus tacubayae Hopkins*, en árboles de cedro blanco bajo el método de inyección con jeringa, en Chapingo, México.

Dentro de las recomendaciones se menciona que para la aplicación de las inyecciones sistémicas se debe considerar la época de crecimiento y el inicio del ciclo biológico de los insectos plaga (Franco-Islas, 2001).

Se han realizado ensayos con endoterapia en palmeras, para el control del picudo rojo (*Rhynchophorus ferrugineus*), con resultados prometedores (Azam y Razvi, 2001; Hernández- Marante *et al.*, 2003; Dembilio *et al.*, 2014).

En México se han realizado la endoterapia para el control del mayate prieto del cocotero (*Rhynchophorus palmarum*) (Sistema Producto Coco del Estado de Jalisco, 2000).

## **2.11 Aplicación de nematodos mediante endoterapia vegetal**

Kaya y Nelson, (1985) investigaron la aplicación de JI en geles de alginato para incrementar la persistencia y esta práctica fue comercializada en la aplicación de nemátodos en troncos de árboles.

Abbas *et al.*, (2000), mencionan que *Steinernema riobravis* aplicado mediante inyección en el tronco de la palmera datilera contra larvas del picudo rojo (*Rhynchophorus ferrugineus*), a razón de 50-200 ml (500 JI/ ml) por túnel ocasionó una mortalidad de 25 %.



### III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

#### 3.1 Objetivo general

Aislar, identificar y evaluar la capacidad de nematodos entomopatógenos nativos de plantaciones de agave en Oaxaca para el control del picudo del agave (*Scyphophorus acupunctatus*).

#### 3.2 Objetivos específicos

1.- Aislar nemátodos entomopatógenos de suelos cultivados con agave mezcalero.

2. Identificar los nemátodos aislados con técnicas moleculares (secuenciación de la región ITS y de la subunidad 28S).

3. Determinar las dosis y tiempos letales de los nemátodos aislados sobre larvas del picudo del agave (*Scyphophorus acupunctatus*) en laboratorio.

4.- Realizar tratamientos de aplicación en campo de nematodos en plantas con presencia de daño por picudo del agave por aspersión y endoterapia.

#### 3.3 Hipótesis

El agroecosistema de agave mezcalero en los Valles Centrales de Oaxaca contiene al menos una especie de nemátodos entomopatógenos, la cual tiene una virulencia diferente para el control del picudo del agave (*Scyphophorus acupunctatus*), así como diferentes concentraciones letales en laboratorio.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Área de estudio y sitio experimental

Las muestras de suelo fueron colectadas de áreas cultivadas con agave (*Agave angustifolia* Haw) en Santiago Matatlán, San Juan Guelavía (Tlacolula), Ocotlán Cuilapam y Zaachila en los Valles Centrales de Oaxaca. Esta región se ubica en las coordenadas 16° 57" N y 96° 28" O, una altitud de 1400-1600 msnm, con una temperatura media que oscila entre 20 y 24 °C, una precipitación media de 1000 mm (García, 1988).

El trabajo de detección e identificación de los nemátodos entomopatógenos se realizó en el laboratorio de Control Biológico del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR) Unidad Oaxaca del Instituto Politécnico Nacional (IPN), ubicado en Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca y en el Laboratorio de Bioinsecticidas (Departamento de Biotecnología y Bioquímica) en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV), ubicado en Irapuato, Guanajuato, México.

Los experimentos de campo se desarrollaron en un predio sembrado con *Agave angustifolia* Haw de la comunidad de San Juan Guelavía perteneciente al Distrito de Tlacolula.

### 4.2 Cría de *Galleria mellonella* (L.)

Este procedimiento se efectuó de acuerdo a las especificaciones de Woodrig y Kaya (1988). Utilizando larvas del último estadio de la polilla mayor de la cera como trampa cebo, para la detección y multiplicación *in vivo* de los NEP.

### 4.3 Recolección de las muestras

Se colectaron muestras de suelo en cinco zonas productoras de agave mezcalero (*Agave angustifolia* Haw). La recolección de las muestras se realizó durante 2011-2012. Dentro del cultivo se seleccionaron 1-3 puntos al azar, y en cada uno de ellos se recolectaron tres muestras de suelo con una pala cuadrada,

a una profundidad de 10-20 cm, de aproximadamente 1 kg, cubriendo un área de aproximadamente 20 m<sup>2</sup>, de donde se colectaron al menos 100 m de separado en cada sitio, según Stock *et al.* (1999).

Las muestras en cada sitio, se mezclaron uniformemente y se depositaron en una bolsa de polietileno, para evitar la pérdida de humedad, se etiquetaron y colocaron en una hielera para mantenerlas en condiciones de frío durante su traslado al laboratorio, donde se almacenaron a 5°C hasta su procesamiento.

#### **4.4 Aislamiento de los nemátodos entomopatógenos**

Con la finalidad de obtener nemátodos entomopatógenos en las muestras de suelo, de cada muestra de suelo se colocó una cantidad de 300 g en un recipiente de plástico de 500 ml con la tapa de plástico con orificios para asegurar la aireación, humedeciendo la muestra obtenida con agua destilada estéril (ADE). Enseguida a cada contenedor se le agregaron cinco larvas del último estadio de *G. mellonella*, los cuales se taparon e invirtieron permaneciendo a temperatura ambiente (25±3°C) durante siete días (Stock *et al.*, 1999).

Después del período de incubación las larvas se recuperaron para su examinación. Los cadáveres se recolectaron, se lavaron con agua destilada estéril, y se desinfectaron superficialmente por inmersión en hipoclorito de sodio al 0.1% durante 30 segundos, después se pasaron tres veces en recipientes con agua destilada estéril (Woodring y Kaya, 1988). Enseguida, se colocaron dentro de una caja de petri (60 x 15 mm) sobre un papel filtro Wartman No. 2.

Después de 2 a 3 días en la caja de Petri los cadáveres que mostraron signos y síntomas característicos de infecciones por nemátodos entomopatógenos como: larvas flácidas, coloración de blanco a café claro (*Steinernema*) y color marrón (*Heterorhabditis*) (Poinar, 1979), se examinaron bajo un microscopio estereoscópico, para comprobar la presencia de NEP (Hominick y Briscoe, 1990).

Posteriormente, para recolectar los juveniles infectivos que emerjan de los cadáveres, se transfieren las larvas muertas en trampas de White (1927) modificada, que consiste en una caja de petri (60 mm de diámetro) invertida, colocada dentro de otra caja de Petri (100 x 15 mm), donde los cadáveres de *G. mellonella*, se colocarán sobre un papel filtro Wartman del No. 2 situado sobre la caja de Petri cubierta (60 mm), agregando 5 ml de agua destilada estéril a cada caja (100 x 15 mm). Los cadáveres se incuban a  $25\pm 3^{\circ}\text{C}$  y permanecen en la trampa por una semana, para que los juveniles infectivos emerjan y migren dentro del agua (Hominick y Briscoe, 1997). Se colectaron dentro de los primeros cinco días de iniciada la emergencia de los juveniles infectivos de los cadáveres (Nguyen y Smart, 1995).

#### **4.5 Postulados de Koch's**

Con la finalidad de comprobar los postulados de Koch y su patogenicidad, se colocaron cinco larvas del último estadio de *G. mellonella* sobre un papel filtro húmedo previamente tratado con una suspensión de 100 JI aislados en una caja Petri (100 x 15 mm). Aproximadamente en 24-48 horas se confirma si los nemátodos son entomopatógenos, ya que rapidez de la infección y muerte del insecto es un indicador de que el nemátodo está actuando como un entomopatógeno.

Posteriormente, los juveniles infectivos que emergieron durante los 2-4 días en la trampa de White, se conservarán en matraces de 250 ml en agua destilada estéril, manteniéndolos en refrigeración a  $10^{\circ}\text{C}$  (Woodring y Kaya, 1988), con el fin de realizar su identificación al nivel de género y especie.

#### **4.6 Multiplicación de nemátodos**

La multiplicación de nemátodos se realizó colocando 200 juveniles infectivos contenidos en 1 ml de suspensión de ADE de cada aislamiento en una

caja petri con papel filtro, posteriormente se colocaron 10 larvas de *G. mellonella*; las cajas se pusieron cámara húmeda e incubaron a  $25\pm 3^{\circ}\text{C}$  durante cuatro días, posteriormente las larvas se colocaron en trampa White e incubaron a  $25\pm 3^{\circ}\text{C}$  por una semana. Los nemátodos que emergieron de la trampa se cosecharon por cuatro días, lavándolos con agua destilada, tres veces. Después se almacenaron en matraces de 250 ml con agua destilada estéril, manteniéndolos en refrigeración a  $10^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.7 Cuantificación de nemátodos**

Se tomó una muestra con la finalidad de observar las formas móviles de los nemátodos al microscopio estereoscópico. Una vez observados los nemátodos vivos, se tomó 100  $\mu\text{l}$  de esta suspensión (solución madre) y se complementó a 1000  $\mu\text{l}$  de ADE. Tomando 100  $\mu\text{l}$  de esta suspensión, se colocó sobre una caja Petri dividida en cuadrantes, para efectuar un conteo al estereoscopio y determinar la cantidad de nemátodos, contenidos en los 100  $\mu\text{l}$  de la dilución.

El procedimiento anterior se efectuó con la finalidad de determinar la concentración de la solución madre (JI/ml).

La obtención de las concentraciones a emplearse en los bioensayos consistió en multiplicar los mililitros a utilizar en cada tratamiento, por la concentración deseada de JI por ml, y dividido entre el número de JI observados en la solución original (1:10), utilizando la siguiente fórmula:

$$\mathbf{A = D \times C/B}$$

Donde:

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

D= Volumen final, en mililitros de (ADE) agua destilada estéril, de la nueva suspensión.

C= Concentración deseada (JI/ml) en la nueva dilución

B= Número de JI/ml de la suspensión madre.

Obteniendo el volumen de JI a extraer de la solución original, ajustado con ADE lo que resta para obtener la concentración de JI/ml (**D-A**) (Woodring y Kaya, 1998).

#### **4.8 Caracterización molecular de los nemátodos aislados**

Extracción de DNA. Se depositaron 100 JI en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, y después se adicionaron 400  $\mu$ l de solución buffer de lisis (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.2, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.45% NP40, 0.45% Tween 20) y 1  $\mu$ l de proteinasa K (60  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>). Los tubos se congelaron a -80°C durante 10 minutos, posteriormente se incubaron a 65°C por 1 hora, y después a 95°C por 10 minutos. Se colocaron en hielo por 5 minutos y se centrifugaron a 12,000 rpm por 2 minutos. El sobrenadante conteniendo el DNA se transfirió a un tubo Eppendorf y se almacenó a 4°C (Nguyen *et al.*, 2001).

Amplificación por PCR (Subunidad 28S). Se utilizaron los iniciadores directo # 391 (5' -AGCGGAGGAAAAGAACTAA-3') y reverso #501 (5' TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3') (Stock *et al.*, 2001). Se utilizó la mezcla (2.5  $\mu$ l de buffer 10X, 3  $\mu$ l de 2mM MgCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ l de DNTP's, 1  $\mu$ l de iniciadores, 0.25  $\mu$ l de Taq DNA Polimerasa, 1  $\mu$ l de DNA y el resto de agua destilada estéril) en un volumen de reacción de 25  $\mu$ l; la incorporación de la reacción se realizó en hielo. Los parámetros para la PCR fueron: desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos, 33 ciclos de 94°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos y 72°C por 1 minuto, con una extensión final a 72°C por 7 minutos. Las reacciones fueron llevadas a cabo en un termociclador (Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler). Los productos de la PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1% en TAE 1X, el tamaño del producto esperado fue de 955 bp.

Amplificación por PCR (Región ITS). Se utilizaron los iniciadores 18S (5'TTGATTACGTCCCTGCCCTTT-3') y 26S (5'-TTTCACTCGCCGTTACTAAGG-3') (Shahina *et al.*, 2010). Se utilizó la mezcla (5µl 10X PCR buffer (500mM KCl, 100mM Tris-HCl pH 8.4, 15mM MgCl, 1% Triton X-100, 1µl de cada uno de los iniciadores (directo y reverso), 2 µl de mezcla de dNTP (5mM para cada uno), 0.5 µl de Tag DNA polimerasa, 38 µl de agua destilada estéril y 2.5 µl de DNA) en un volumen de reacción de 50 µl. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial 94°C por 4 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 s, 48°C por 30 s, 72°C por 2 minutos, con una extensión final a 72°C por 10 minutos. Los productos de la PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa (1%) y las imágenes fueron obtenidas en un fotodocumentador BioRad (Shahina *et al.*, 2010).

Secuenciación y análisis de las secuencias. Los amplicones obtenidos fueron enviados a secuenciar a la compañía MacroGen (USA).

Las secuencias que se obtuvieron se alinearon con el programa DNA Baser Sequence Assembler y se compararon con las secuencias existentes en el banco de genes NCBI (National Center of Biotechnology Information) a través del programa bioinformático BLAST (Mekete *et al.*, 2005) para la búsqueda de secuencias similares.

#### **4.9 Patogenicidad de los aislados contra larvas de *Scyphophorus acupunctatus***

Una vez identificados los aislados de nemátodos entomopatógenos, se probó su patogenicidad contra larvas de *S. acupunctatus*. Para ello, se estableció un experimento bajo un diseño completamente al azar, con cuatro repeticiones. Se evaluaron las especies *S. carpocapsae* y *S. websteri* en tres concentraciones: 100, 500 y 1000 JI/larva, las cuales se agregaron en 1 ml de suspensión que se distribuyó con una pipeta uniformemente sobre la superficie del papel filtro de cada caja Petri. Fueron empleadas diez larvas por unidad experimental, resultando un total de seis tratamientos más un testigo o control al cual sólo se le agregó 1 ml de agua destilada sin nematodos (Cuadro 2). Los juveniles infectivos (JI) fueron

cuantificados ( $\approx$  10 conteos) y ajustada su densidad a 800 nemátodos/ml de agua destilada estéril, para luego preparar las concentraciones de nemátodos, las cuales fueron calculadas de acuerdo a la fórmula expuesta por Woodring y Kaya (1988). Las larvas de tercer instar de *S. acupunctatus* fueron obtenidas de plantas dañadas de agave (*Agave angustifolia* Haw). Las larvas se mantuvieron en observación durante 24 horas y se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 0.1% durante 30 segundos y después de lo cual se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Solamente las larvas de apariencia saludable de *S. acupunctatus* fueron usadas para evaluar la eficacia de los nemátodos.

Posterior a la inoculación con los nemátodos entomopatógenos, las larvas fueron alimentadas con un trozo de piña de agave. Las condiciones bajo las cuales se llevaron a cabo las fases experimentales en el laboratorio fueron de  $25\pm 3$  °C,  $70\pm 5$  % de humedad relativa y obscuridad total. Cada 24 horas, durante un período de cinco días, fueron revisadas las cajas de Petri para determinar el porcentaje de mortalidad de larvas. Las larvas muertas se sometieron a un proceso de disección siendo observadas en un microscopio estereoscópico, para determinar la presencia de nemátodos y confirmar de esta manera su muerte a causa de éstos. Las larvas en las cuales se corroboró su muerte por nemátodos se colocaron individualmente en trampas White y se esperó la emergencia de los JI de los cadáveres.



**Cuadro 2.** Tratamientos aplicados en el experimento (Bioensayo).

Tratamiento	Cepa nativa de nemátodo entomopatógeno	Concentración (JI)
1	<i>Sw</i>	100
2	<i>Sw</i>	500
3	<i>Sw</i>	1000
4	<i>Sc</i>	100
5	<i>Sc</i>	500
6	<i>Sc</i>	1000
7	Testigo	1 ml de ADE

*Sw.* *Steinernema websteri*; *Sc:* *Steinernema carpocapsae*

#### 4.10 Aplicación de nematodos en campo mediante aspersión

En el año 2014 (abril-junio y agosto-octubre) se realizaron dos experimentos de campo para comprobar la efectividad de los nematodos entomopatógenos sobre larvas de *S. acupunctatus*, en la comunidad de San Juan Guelavía, perteneciente al distrito de Tlacolula de Matamoros, Oaxaca, México. Las plantas de agave seleccionadas para la aplicación de los tratamientos tenían de 8 a 10 años de edad y presentaban afectación de *S. acupunctatus*. En estas parcelas no se habían aplicado medidas de saneamiento de ningún tipo. Se utilizó un diseño completamente al azar con 3 tratamientos (un millón de JI/litro de agua destilada estéril de los nematodos *Steinernema websteri* y *Steinernema carpocapsae*, es decir, en suspensión acuosa, y el testigo, el cual consistió en un litro de agua destilada estéril) y 3 repeticiones. La aplicación de los tratamientos fueron dirigidos directamente a la base de la planta con una aspersora manual (atomizador) de 1.5 L de capacidad y la aplicación se realizó por la tarde después de las 17:00 horas, esto con la finalidad de que los nemátodos no sufrieran afectación por la radiación solar.

Para determinar si hubo efecto de tratamientos, 60 días pos-tratamiento, las piñas se abrieron completamente utilizando un machete y se registró si había

presencia de larvas muertas en ese momento en el interior de las piñas (Aquino-Bolaños, *et al.*, 2006).

#### **4.11 Aplicación de nematodos en campo mediante endoterapia**

En octubre de 2014 se realizó un experimento de campo para comprobar la efectividad de los entomopatógenos sobre larvas de *S. acupunctatus*, en la comunidad de San Juan Guelavía, perteneciente al distrito de Tlacolula de Matamoros, Oaxaca, México. Las plantas de agave seleccionadas para la aplicación de los tratamientos tenían de 8 a 10 años de edad y presentaban afectación de *S. acupunctatus*. En estas parcelas no se habían aplicado medidas de control de ningún tipo. Se utilizó un diseño completamente al azar con 3 tratamientos (un millón de JI/litro de agua destilada estéril de los nematodos *Steinernema websteri* y *Steinernema carpocapsae*, es decir, en suspensión acuosa, y el testigo, el cual consistió en un litro de agua destilada estéril) y 2 repeticiones. La aplicación de los tratamientos consistió en taladrar en diferentes partes de la piña del agave y después inyectar los nematodos directamente. La aplicación se realizó por la tarde después de las 17:00 horas, esto con la finalidad de que los nematodos no sufrieran afectación por la radiación solar.

Para determinar si hubo efecto de tratamientos, 60 días pos-tratamiento, las piñas se abrieron completamente utilizando un machete y se registró si había presencia de larvas muertas en ese momento en el interior de las piñas (Aquino-Bolaños, *et al.*, 2006).

#### **4.12 Análisis estadístico**

Los porcentajes de mortalidad obtenidos en los tratamientos se compararon mediante un análisis de varianza (ANOVA) para determinar la existencia de significancia estadística entre ellos, para proceder, si ese fuera el caso a una comparación de medias a través de la prueba de Tukey ( $P > 0.05$ ) (SAS Institute, 2002). Previo al ANOVA se verificó que los datos cumplieran con el supuesto básico de homogeneidad de varianzas a través de la prueba de Bartlett (SAS Institute, 2002). Las concentraciones letales (CL<sub>50</sub> y CL<sub>90</sub>) fueron obtenidas mediante análisis Probit (SAS Institute, 2002), siguiendo los requisitos estadísticos recomendados por Ibarra y Federici, (1987).

## V. RESULTADOS

### 5.1 Aislamiento de nematodos entomopatógenos

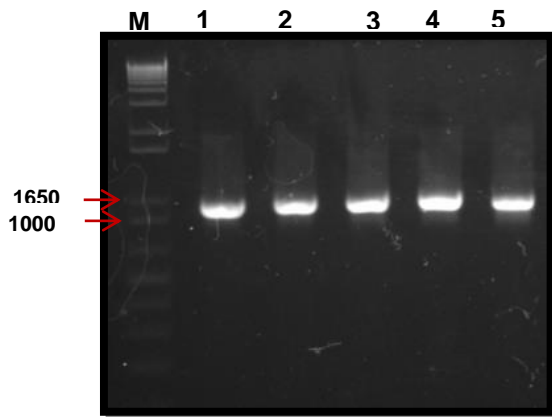
Un total de 60 muestras de la región productora de agave (*Agave angustifolia* Haw) en los Valles Centrales de Oaxaca fueron examinadas, de las cuales cinco poblaciones resultaron positivas para aislamientos de nematodos (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Aislados de nematodos procedentes de suelo en cultivos de *Agave angustifolia* Haw en diferentes localidades de Oaxaca, México.

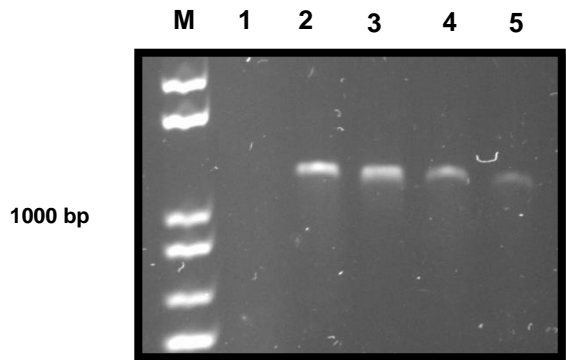
No. de muestra	Localidad	Coordenadas
2	Matatlán	Longitud: 16° 50.298'N Latitud: 96° 22.298'O
3	San Juan Guelavía	Longitud: 16° 56" 28.8'N Latitud: 96° 32" 58.9'O
5	San Juan Guelavía	Longitud: 16° 55" 52.9'N Latitud: 96° 32.55'O
6	Cuilapam (Rancho Quemado)	Longitud: 17° 01.52'N Latitud: 96° 47.79'O
12	Zaachila	Longitud: 16° 57' 4.6"N Latitud: 96° 46' 33.9"O

## 5.2 Identificación Molecular

Se amplificaron los segmentos del gen 28S con los oligonucleótidos # 391 y #501 (producto esperado de 955 pb). Para la amplificación de la región ITS SE utilizaron los iniciadores 18S y 26S. El producto de PCR fue separado por electroforesis en un gel de agarosa al 1% (Figura 4 y 5).



**Figura 4.** Producto de amplificación de PCR 28S de especímenes aislados en cultivos de *Agave angustifolia* Haw en Oaxaca, México. 1. *S.carpocapsae* All; 2. S. Juan Guelavía; 3. Cuilapam; 4. Zaachila; 5. Matatlán; M. Marcador de peso molecular 1Kb.



**Figura 5.** Producto de amplificación de PCR de ITS de especímenes aislados en cultivos de *Agave angustifolia* Haw en Oaxaca, México. 1. *S.carpocapsae* All; 2. S. Juan Guelavía; 3. Cuilapam; 4. Zaachila; 5. Matatlán; M. Marcador de peso molecular 1Kb.

Cada una de las secuencias de los productos de PCR (Anexo 1) se compararon con las bases de datos de nucleótidos del GenBank mediante el programa BLAST del NCBI (National Center of Biotechnology Information). Las poblaciones de los nemátodos aislados se identificaron molecularmente como: *Steinernema websteri* (en Matatlán), *S. carpocapsae* (en San Juan Guelavía), *Rhabditis rainai* (en San Juan Guelavía), *S. carpocapsae* (en Cuilapam) y *S. carpocapsae* (en Zaachila). Los cuatro aislamientos del género *Steinernema* se reprodujeron satisfactoriamente en *G. mellonella*, confirmando su naturaleza entomopatógena. Así mismo, el nemátodo *Metarhabditis (Rhabditis) rainai* ocasionó la muerte de la *G. mellonella*, pero la larva fue consumida casi en su totalidad, lo cual indica un comportamiento de tipo saprofítico.

En el cuadro 4 se presenta la información de las secuencias alineadas con los máximos porcentajes de identidad y cobertura.

**Cuadro 4.** Secuencias de mayor alineación con las secuencias de los aislados de nemátodos entomopatógenos nativos en cultivos de *Agave angustifolia* Haw en Oaxaca, México.

Localidad	Oligonucleótido utilizado	Nombre del nemátodo identificado	Cobertura	Identidad	No. acceso GenBank
Matatlán	28SR y 28SF	<i>S. websteri</i> (N2)	98%	100%	AY841762.1
San Juan Guelavía	18S y 26S	<i>S. carpocapsae</i> (N3)	96%	100%	AF121049.1
San Juan Guelavía	28SR y 28SF	<i>Metarhabditis (Rhabditis) rainai</i> (N5)	95%	100%	EU195966.1
Cuilapam	18S y 26S	<i>S. carpocapsae</i> (N6)	99%	99%	AF121049.1
Zaachila	18S y 26S	<i>S. carpocapsae</i> (N12)	98%	99%	AF121049.1

### 5.3 Patogenicidad de los aislados contra larvas de *Scyphophorus acupunctatus*

La prueba de Bartlett aplicada a los datos obtenidos del experimento, en el cual no hubo mortalidad en el tratamiento testigo, mostró que éstos presentaban homogeneidad de varianzas ( $Pr > ChiSq = 0.2950$ ), condición necesaria para la validez del análisis de varianza.

El análisis de varianza mostró significancia estadística entre tratamientos ( $P < .0001$ ); el coeficiente de determinación  $R^2$  fue de 0.96, lo cual indica que el modelo explica el 96% de la variación de la mortalidad en función de los tratamientos; mientras que el coeficiente de variación fue de 11.13%, el cual se considera adecuado de acuerdo con la norma empírica de que en trabajos de laboratorio, de preferencia, este no debe ser mayor de 20% Ibarra y Federici, (1987) (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Análisis de varianza de mortalidad larval de *Scyphophorus acupunctatus*.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F Calculada	P>F
Modelo	6	283.36	47.23	79.34	<.0001
Error	21	12.5	0.595		
Total	27	295.86			

$R^2 = 0.96$ ; C.V. =11.13%

La máxima mortalidad (100%) de larvas de *S. acupunctatus* se obtuvo con el nemátodo *S. websteri* (N2) a una concentración de 1000 JI/larva, después de 72 horas de aplicados los tratamientos, mientras que a una concentración de 500 JI/larva, en el mismo periodo, produjo una mortalidad de 85%. Por otra parte *S. carpocapsae* (N3) causó el 95 y 85% de mortalidad con 1000 y 500JI/larva, respectivamente. Las dos especies de nemátodos obtuvieron las mayores mortalidades con la concentración de 1000 JI/larva; sin embargo, estadísticamente no hubo diferencia significativa al aplicar uno u otro nematodo a las concentraciones de 1000 y 500 JI/larva. A una concentración de 100 JI/larva *S.*

*websteri* y *S. carpocapsae* produjeron mortalidades de 62.5 y 52.5%, respectivamente, estos dos datos se agrupan en una misma categoría estadística y presentan significancia estadística con respecto a las mortalidades causadas por ambos nemátodos en concentraciones de 1000 y 500 JI/larva (Cuadro 6).

**Cuadro 6.** Mortalidad de larvas de *S. acupunctatus* por nemátodos entomopatógenos en diferentes concentraciones, a las 72 horas de aplicados los tratamientos.

Nemátodo	Concentración(JI/larva)	% de mortalidad
<i>S. websteri</i>	1000	100 a*
<i>S. carpocapsae</i>	1000	95.0 a
<i>S. websteri</i>	500	85.0 a
<i>S. carpocapsae</i>	500	85.0 a
<i>S. websteri</i>	100	62.5 b
<i>S. carpocapsae</i>	100	52.5 b

\*Valores con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey  $P < 0.05$ ). JI: juveniles infectivos

Considerando los resultados de mortalidad obtenidos a las 72 h después de aplicados los nemátodos a las larvas, se calcularon las concentraciones letales (CL) mediante el análisis Probit (SAS Institute, 2002). Las CL<sub>50</sub> y CL<sub>90</sub> y los límites fiduciales para cada una de éstas, correspondientes al 95% se presentan en el Cuadro 7.

*S. websteri* presentó una concentración letal media (CL<sub>50</sub>) de 168 JI, mientras que *S. carpocapsae* tuvo una CL<sub>50</sub> de 147 JI. En cuanto a la CL<sub>90</sub> para *S. websteri* fue de 890 JI y para *S. carpocapsae* de 3,739 JI.



**Cuadro 7.** Concentraciones letales (CL<sub>50</sub> y CL<sub>90</sub>) y límites fiduciales (LF), para dos especies de nemátodos entomopatógenos aplicados a larvas de *S. acupunctatus* en condiciones de laboratorio.

<b>Nemátodo</b>	<b>CL<sub>50</sub> (95% LF)</b>	<b>CL<sub>90</sub> (95% LF)</b>
<i>S. websteri</i> (N2)	168 (102-238)	890 (583-1,894)
<i>S. carpocapsae</i> (N3)	147 (29-271)	3,739 (1,337-188,710)

CL: Concentración letal; LF: Límites fiduciales.

Teniendo en cuenta que el tratamiento en donde se obtuvieron los mayores porcentajes de mortalidad para ambas especies de nematodos fue 1000 JI/larva, se determinaron los tiempos letales (TL) para esta concentración mediante el análisis Probit (SAS Institute, 2002). Los TL<sub>50</sub> y límites fiduciales (LF) para cada una de éstos, correspondientes al 95% se presentan en el Cuadro 8.

**Cuadro 8.** Tiempos letales (TL<sub>50</sub> y TL<sub>90</sub>) y límites fiduciales (LF), para dos especies de nemátodos entomopatógenos aplicados a larvas de *Scyphophorus acupunctatus* en condiciones de laboratorio.

<b>Tiempo letal (h)</b>	<b><i>S. websteri</i> (1000 JI/ larva) (95% LF)</b>	<b><i>S. carpocapsae</i> (1000 JI/ larva) (95% LF)</b>
TL <sub>50</sub>	38.5 (2.1-53.8)	46.7 (36.9-1016.5)
TL <sub>90</sub>	51.2 (5.4-75.1)	90.3 (59.0-2686.6)

TL: Tiempo letal; LC: Límites fiduciales; h: Horas.

*S. websteri* mostró un TL<sub>50</sub> de 38.5 horas mientras que *S. carpocapsae* presentó un TL<sub>50</sub> de 46.7 horas. Así mismo el TL<sub>90</sub> es menor para *S. websteri* (51.2 h) comparado con *S. carpocapsae* (90.3 h).

#### **5.4 Aplicaciones en campo**

Las aplicaciones de nematodos en suspensión acuosa mediante aspersión no produjeron mortalidad en las larvas de *S. acupunctatus* presentes en las plantas tratadas a los dos meses post-aplicación.

En cuanto a la aplicación de nematodos mediante endoterapia en plantas de agave (Anexo 2) dió resultados negativos al no haberse encontrado larvas muertas dentro de las plantas tratadas.

## VI. DISCUSIÓN

El porcentaje de muestras que mostraron presencia de nemátodos entomopatógenos en este trabajo fue de 6.6%, cifra que es menor a lo reportado en otros estudios: 6.9% en Etiopía (Mekete *et al.*, 2005), 7% en Chile (Edgington *et al.*, 2010) 12% en Costa Rica (Uribe-Lorío *et al.*, 2005), 12.08% en Brasil (Dolinski *et al.*, 2008), 23.8% en cinco estados del Pacífico centro mexicano (González-Ramírez, 2006), 26.3% en California (Stock *et al.*, 1999) y 49.1% en Valles centrales de Oaxaca, México (Girón *et al.*, 2012). Sin embargo, se debe tener cuidado al realizar las comparaciones, puesto que algunas diferencias pudieran deberse al tipo de muestreo, a las técnicas de identificación empleadas y a los diferentes insectos cebo que fueron empleados en los estudios reportados. En la mayoría de los casos en los que la tasa de recuperación de NEPs es elevada, los sitios de muestreo fueron seleccionados en función de la presencia del insecto plaga hospedero (Uribe-Lorío *et al.*, 2005), un insecto trampa empleado fue *G. mellonella*, o fue utilizada una combinación de dos métodos de extracción (Wang *et al.*, 2014), como pueden ser enterrar tubos de centrifuga perforados conteniendo en su interior larvas de *G. mellonella* o algún otro insecto (Gruner *et al.*, 2007).

En nuestro estudio únicamente se utilizó *G. mellonella* como insecto trampa. La baja presencia de NEPs en este caso, remarca la importancia de llevar a cabo un muestreo intensivo empleando más de un método de colecta para incrementar el porcentaje de recuperación de NEPs.

La presencia de los NEPs en el suelo varía por numerosos factores, tales como textura, humedad y pH (Lacey y Kaya, 2000). Koppenhofer *et al.* (2006) encontraron que los nemátodos del género *Steinernema* pueden sobrevivir en suelos con baja humedad, mientras que Stuart *et al.* (2006), mencionan que es más factible detectar NEPs en sistemas de labranza reducida. En el presente trabajo, los NEPs se aislaron de muestras provenientes de suelos

moderadamente ácidos, con bajo contenido de humedad durante el periodo invernal y con poca o nula labranza.

El análisis de la Subunidad 28S y la región ITS con técnicas moleculares de las cinco poblaciones de nemátodos aislados, permitió identificar la homología de sus secuencias al compararlas con la base de datos de secuencias en el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Las secuencias obtenidas correspondieron a especies de dos géneros distintos de nemátodos, los cuales son *Metarhabditis* (*Rhabditis*) y *Steinernema*.

El género *Metarhabditis* se reporta por primera vez en Oaxaca, siendo la especie *rainai*, aunque en México se ha reportado previamente *Metarhabditis* (*Rhabditis*) *rainai* en Guasave, Sinaloa, México (Vázquez-Montoya, 2012). Así mismo, *Metarhabditis* (*Rhabditis*) *rainai* ha sido reportado en Brasil en muestras de suelo obtenidas de campos cultivados con soya (Tomazini, et al., 2012).

El presente estudio reporta por primera vez la presencia de *Steinernema websteri* en Oaxaca y en México. El primer aislado de *S. websteri* fue obtenido en Beijin, China (Cutler y Stock, 2003). Desde entonces, *S. websteri* ha sido reportado en muestras de suelo de Colombia (López-Nuñez, et al., 2007), Estados Unidos (Nguyen et al., 2007).

La secuencia de la subunidad 28S obtenida de especímenes aislados de la población de San Juan Guelavía resultaron homólogas al nemátodo *Metarhabditis* (*Rhabditis*) (Carta y Osbrink, 2005), el cual está dentro de la familia Rhabditidae. Se ha descrito que esta familia de nemátodos posee actividad forética o saprofítica (se alimentan del cadáver) (Carta y Osbrink, 2005) ó necronemico (Stock, 2012). Sin embargo, existe un reporte reciente en donde se describe la capacidad entomopatógena de *Rhabditis blumi* contra las plagas de plantas crucíferas: *Artogeia rapae* L., *Mamestra brassicae* L. y *Plutella xylosella* L., tanto en condiciones de laboratorio como de invernadero (Park et al., 2012).

Los nemátodos, como todos los organismos vivos, están en constante evolución. Existe controversia al indicar que sólo las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae (Orden Rhabditida) incluyen especies de nematodos entomopatógenos, puesto que existen reportes de otras familias que están actuando sobre los insectos en forma patogénica al causarles la muerte (Chávez y Vega, 2004; Park *et al.*, 2012). Desafortunadamente, la mayoría de las investigaciones se han enfocado principalmente en estas dos familias, ignorando especies que pudieran estar evolutivamente en el inicio de una relación patogénica y que podrían también considerarse con potencial para ser empleados como alternativa de control biológico de insectos plaga.

Todos los aislados de NEP identificados en el presente estudio fueron del género *Steinernema*, el cual ya había sido aislado previamente en los Valles Centrales de Oaxaca (Ruiz *et al.*, 2003; Girón-Pablo *et al.*, 2012); no se encontraron especies del género *Heterorhabditis*.

En otros países también se ha observado un patrón similar (Mekete *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2014). La ausencia de heterorabdítidos en estos resultados y su menor presencia en los suelos de manera general, puede deberse a las particularidades de su ciclo de reproducción, donde los J1 maduran y dan origen a adultos hermafroditas, los cuales posteriormente dan paso a una o dos generaciones amfimíticas (compuestas por hembras y machos), mientras los steinernemátidos presentan una reproducción sexual al existir desde su maduración, individuos hembras y machos, por lo cual todas las generaciones son amfimíticas, lo cual favorece una mayor diversidad genética y especiación (Hominick *et al.*, 1996). En este sentido Hominick *et al.* (1996), comenta que la biodiversidad de los steinernemátidos es mayor que los heterorabdítidos, por lo que *Steinernema* está adaptado a muchos ambientes (Hominick, 2002), lo cual coincide con los aislamientos descritos hasta la actualidad, pues se han identificado 70 especies de *Steinernema*, mientras que de *Heterorhabditis* solamente 17 especies (Lewis y Clarke, 2012).

Una concentración de 1000 JI de *S. carpocapsae* sobre larvas de tercer instar de *S. acupunctatus* ocasionó el 95% de mortalidad a las 120 horas después de la aplicación. Estos resultados difieren de lo reportado por Aquino-Bolaños *et al.* (2006), quienes registraron mortalidades de 80% a los 11 días y de 100% a los 18 días respectivamente, pero a una concentración de 4500 JI/larva en condiciones de laboratorio. Sin embargo, los porcentajes de mortalidad obtenidos son similares a los reportados por Sepúlveda-Cano *et al.* (2008), quienes obtuvieron una mortalidad de 83.29 % con 1000 JI de *S. carpocapsae* sobre larvas del último instar del picudo del plátano (*C. sordidus*) bajo condiciones de laboratorio, 120 horas después de la aplicación. De acuerdo a Georgis *et al.* (2006), un buen potencial de control está por encima de 70% de efectividad.

En nuestro estudio *S. websteri* ocasionó una mortalidad de 100% en larvas de *S. acupunctatus* a una concentración de 1000 JI/larva, después de 72 horas postratamiento. Delgado-Ochica y Sáenz-Aponte, (2012), reportan que *S. websteri* evaluado sobre larvas de cuarto instar del picudo de la guayaba *Conotrachelus psidii* Marshall (Coleoptera: Curculionidae), a razón de 100 JI/larva ocasionó 25% de mortalidad sobre las larvas del picudo en 72 horas en laboratorio. Una posible explicación puede ser la edad del hospedero, la cual juega un papel importante, ya que se ha demostrado que en general las larvas de menor edad han sido más susceptibles a la infección inducida por los JI de NEP (Toledo *et al.*, 2005).

Las dos especies de nematodos en todas las concentraciones evaluadas, lograron reproducirse en larvas de *Scyphophorus acupunctatus*.

En lo que respecta a los valores de las concentraciones letales, el rango observado fue aceptable, ya que Girón *et al.* (2012), reportaron CL<sub>50</sub> de 382 JI/larva de *S. carpocapsae* en larvas de *Phyllophaga vetula*.

Los resultados de tiempos letales (TL<sub>50</sub> y TL<sub>90</sub>) muestran para *S. websteri* un TL<sub>50</sub> de 38.5 horas y un TL<sub>90</sub> de 51.2 h, mientras que *S. carpocapsae* presentó

un TL<sub>50</sub> de 46.7 horas y un TL<sub>90</sub> de 90.3 h. Ruiz-Vega *et al.*, (2003), encontraron un TL<sub>50</sub> comprendido entre 3-7 días para *S. carpocapsae* contra larvas de *Phyllophaga vetula*. Así mismo, Sepúlveda-Cano *et al.*, (2008), mencionan un TL<sub>50</sub> de 37.23 horas de *S. carpocapsae* sobre larvas del último instar de *Cosmopolites sordidus*.

Las aplicaciones en suspensión acusa de nemátodos entomopatógenos mediante aspersión, no produjeron mortalidad en larvas o adultos presentes dentro de las plantas de agave, lo cual se atribuyó a la inhabilidad de los NEP para penetrar al interior de la planta, dado que las plantas con afectación por picudos del agave, pero no en estado avanzado de daño, no permiten el ingreso al interior de la piña de los nemátodos debido a la conformación de sus hojas, a diferencia del estudio precedido por Aquino-Bolaños *et al.* (2006), quienes seleccionaron la planta que presentaba en ese momento el mayor grado de avance en pudrición del cogollo para realizar los tratamientos y posiblemente a condiciones ambientales de alta temperatura y baja humedad en las fechas de aplicación.

Los resultados del ensayo realizado en campo con la técnica de endoterapia fueron negativos, pues no se registró mortalidad larval, lo cual pudo deberse entre otras cosas, a sustancias como los cristales de oxalato de calcio, presentes en la savia de la planta de agave (Prychid y Rudall, 1999), lo cual evitó el desplazamiento de los nemátodos y por ende su contacto con las larvas. Otro posible factor que influyó pudo ser la depredación realizada por ácaros que conviven con las poblaciones de *Scyphophorus acupunctatus*. Esa depredación ácaro-nemátodo fue corroborada en laboratorio.

## VII. CONCLUSIONES

Se aislaron cinco poblaciones de nematodos en suelos cultivados con agave (1 Matatlán, 2 San Juan Guelavía, 1 Cuilapam y 1 Zaachila) en los Valles Centrales de Oaxaca, empleando la técnica de insecto trampa y realizando los postulados de Koch en larvas de *Galleria mellonella*.

Las poblaciones de los nemátodos aislados se identificaron molecularmente como: *Steinernema websteri* (en Matatlán), *S. carpocapsae* (en San Juan Guelavía), *Rhabditis rainai* (en San Juan Guelavía), *S. carpocapsae* (en Cuilapam) y *S. carpocapsae* (en Zaachila).

Al evaluar la susceptibilidad de larvas de *Scyphophorus acupunctatus* en condiciones de laboratorio, los resultados indican que dos especies de nematodos entomopatógenos aisladas en este estudio: *S. carpocapsae* y *S. websteri*, presentaron buen potencial para el control del picudo del agave.

Los tratamientos en donde se obtuvieron los mayores porcentajes de mortalidad para ambas especies de nemátodos fue 1000 JI/larva.

Sin embargo, una vez más queda demostrado que los resultados con nemátodos entomopatógenos en campo son muy distintos al comportamiento mostrado en laboratorio, pues bajo esta condición se observó mortalidad del insecto-plaga. Al respecto, debe continuarse la investigación sobre métodos de aplicación y formulación de los NEP en condiciones de campo.

En este estudio, se reporta por primera vez la presencia del nemátodo entomopatógeno *S. websteri* en el estado de Oaxaca y en México. Así mismo es el primer reporte de aislamiento para Oaxaca del *Metarhabditis (Rhabditis) rainai* y el segundo en el país después del registrado en Guasave, Sinaloa.



Los resultados de este trabajo, nos indican que lo que sigue es identificar las bacterias simbiontes de los nemátodos entomopatógenos aislados para continuar con el estudio de estos microorganismos y realizar las pruebas pertinentes con el nemátodo *Metarhabditis (Rhabditis) rainai*.

## VIII. LITERATURA CITADA

- Abbas, M. S. T., Hanounik, S. B., Mousa, S. A. y Al-Bagham, S. H. 2000. Soil application of entomopathogenic nematodes as a new approach for controlling *Rhynchophorus ferrugineus* on date palm. *Journal of Nematology*. Vol. 10. 215-218.
- Alatorre R. R. 2013. Nematodos para el control de insectos. En: Taller precongreso. Sociedad Mexicana de Control Biológico. Oaxaca, Oaxaca, del 4-6 Noviembre 2013.
- Alatorre R. R. 2012. Nematodos Entomopatógenos. En: Taller: Teoría de la aplicación de insecticidas microbianos. XXXV Congreso Nacional de Control Biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico. Puebla, México.
- Alatorre, R.R. y A. Guzmán, F. 1999. Nematodos parásitos de insectos. En: Potencial de nematodos entomopatógenos en el control de plagas. H. C. Arredondo., J. Molina (Eds). Universidad de Colima, Col., México. p. 21-22.
- Antonio, B. J. 2004. Sostenibilidad y agroindustria del agave en las unidades socioeconómicas campesinas de los valles centrales de Oaxaca, México. Puebla. Tesis doctoral. Instituto de socioeconomía, estadística e informática. Programa en estrategias para el desarrollo agrícola regional. Colegio de Postgraduados- *Campus* Puebla. 194 p.
- Antonio, B. J. y Terán, M. E. 2008. Estrategias de producción y mercadotecnia del mezcal en Oaxaca. *In: El Cotidiano* Revista de la realidad mexicana actual. División de Ciencias Sociales y Humanidades. Universidad Autónoma Metropolitana- Unidad Azcapotzalco. Marzo- abril. México, D. F. 128:113-121.

- Aquino B., T., J. Ruiz V. J. y Iparraguirre, C. M. 2007. *Scyphophorus acupunctatus* (= *interstitialis*) Gyllenhal (Coleoptera:Curculionidae). Pest of agave mezcalero: Losses and damage in Oaxaca, México. *Revista Científica UDO Agrícola*. 7:1 175-180.
- Aquino B., T., J. Ruiz V. J. y 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, 91-101.
- Arredondo, V. C., P. H. Espinosa. 2005. Fondo Oaxaqueño para la conservación de la Naturaleza. Manual del Magüeyero. Consejo Oaxaqueño del maguey y del mezcal, A. C. Oaxaca, México. P. 20-28.
- Azam, K. M. y Razvi, S.A. 2001. Control of the red palm weevil (*Rhynchophorus ferrugineus* Olivier) using prophylactic spraying of date palms and trunk injections. In: Proceedings of the Second International Conference on Date Palms. Al Ain, UAE. March 25-27.
- Azuara-Dominguez, A. 2013. Factores involucrados en la respuesta del picudo del agave hacia el compuesto feromonal 2-metil-4-octanona y su manejo con agave fermentado e insecticidas sintéticos. Tesis Doctoral. Colegio de postgraduados, Montecillo, Texcoco, México. 76 p.
- Bedding, R. A. y Akhurst, R. J. 1975. A simple technique for the detection of insect rhabditid nematodes in soil. *Nematologica* 21: 109-110.
- Blouin, M.S. 2002. Molecular prospecting for cryptic species of nematodes: mitochondrial DNA versus internal transcribed spacer. *Int. J. for Parasitology* 32: 527–531.

- Boemare, N.E., Boyer-Giglio, M.H., Thaler, J.O., Akhurst, R.J. y Brehélin, M. 1993. Lysogeny and bacteriocinogenic in *Xenorhabdus* spp., bacteria associated with entomopathogenic nematodes. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3032-3037.
- Bravo, M. E. 2003. *Sugerencias para el manejo integrado del picudo del maguey mezcalero (Scyphophorus interstitialis Gyllenhal)*. Folleto No. 4, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Santo Domingo Barrio Bajo, Etna, Oaxaca.
- CAB International. 2011. *Crop Protection Compendium, 2011 Edition*. Wallingford, UK: CAB International. En línea: <http://www.cabi.org/cpc>.
- Camino, L. M., V.R. Castrejón, R. Figueroa, L. Aldana y M. E. Valdés. 2002. *Scyphophorus acupunctatus* (Coleoptera:Curculionidae) attacking *Polianthes tuberosa* (Liliales: Agavaceae) in Morelos, México. *The Florida Entomologist*. 85: 392-393.
- Campos-Herrera, R., Escuer, M., Labrador, S., Robertson, L., Barrios, L. y Gutiérrez, C. Distribution of entomopathogenic nematodes from La Rioja (Northern Spain). *Journal of Invertebrate Pathology*. 95: 125-139.
- Campbell, J. F., y Kaya, H. K. 2000. Influence of insect associated cues on the jumping behavior of entomopathogenic nematodes (*Steinernema* spp.). *Behaviour*. 137: 591-609.
- Campbell, J. F., Lewis, E. E., Yoder, F., y Gaugler, R. 1996. Spatial and temporal distribution of entomopathogenic nematodes in turf. *Parasitology*. 113: 473-482.

- Chávez, I.E. y Vega, F. 2004. Epidemiología de *Metaparasitylenchus hypothenemi* (Tylenchida: Allantonematidae) en la broca del café *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae). En: XXXIII Congreso Nacional de Entomología. Mazatlán, Sinaloa, México.
- Cutler, G.C. and S.P. Stock. 2003. *Steinernema websteri* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae), a New entomopathogenic nematode from China. *Nematol Medit* 31: 215-224.
- COMMAC. 2004. Diagnostico de la cadena productiva del sistema producto maguey-mezcal. SAGARPA, SEDAF, COMMAC. Septiembre 2004. Oaxaca, 165 pp.
- Consejo Regulador del Tequila (CRT). 2005. Plagas y enfermedades del *Agave tequilana* Weber var. Azul. Ed. Pandora. Impreso en México. 123 p.
- Consejo Regulador del Tequila (CRT). 2000. Avances en la investigación científica del *Agave tequilana* Weber var. Azul. Boletín Técnico No. 1. Junio de 2000. Comité Técnico Agronómico, CRT. Guadalajara, Jalisco.
- Cruz, J. E. 2001. Fertilización química y orgánica del agave mezcalero (*Agave angustifolia* Haw) en Oaxaca. Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro". Tesis profesional. Pp.16, 17-20.
- Delgado-Ochica, Y. y A. Sáenz-Aponte. 2012. Virulencia, producción y desplazamiento de nemátodos entomopatógenos sobre larvas del picudo de la guayaba *Conotrachelus psidii* Marshall (Coleoptera: Curculionidae) en laboratorio. *Univ. Sci.* 2012, Vol. 17 (3): 283-290.

- Dembilio, O., Riba, J.M., Gamón M. y Jacas, J.A. 2014. Mobility and efficacy of abamectin and imidacloprid against *Rhynchophorus ferrugineus* in *Phoenix canariensis* by different application methods. *Pest Management Science*. 71: 1091–1098.
- Diario Oficial de la Federación 1994. Norma Oficial Mexicana NOM 070-SCFI-1994. Bebidas alcohólicas-Mezcal-Especificaciones. Tomo DXXV. No. 9, México, D. F. p. 30-39.
- Dembilio, O., Riba, J.M., Gamón M. y Jacas, J.A. 2014. Mobility and efficacy of abamectin and imidacloprid against *Rhynchophorus ferrugineus* in *Phoenix canariensis* by different application methods. *Pest Management Science*. 71: 1091–1098
- Dillon, A. B., Ward, D., Downes, M. J. y Griffin, T. 2006. Suppression of the large pine weevil *Hylobius abietis* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) in pine stumps by entomopathogenic nematodes with different foraging strategies. *Biological Control* 38: 217–226.
- Dolinski, C., F.L. Kamitani, I.R. Machado and C.E. Winter. 2008. Molecular and morphological characterization of heterorhabditid entomopathogenic nematodes from the tropical rainforest in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro 103, 150–159.
- Edgington, S., A.G. Buddie, D. Moore, A. France, L. L. Merino, L.M. Tymo and D.J.Hunt. 2010. Diversity and distribution of entomopathogenic nematodes in Chile. *Nematology* 12, 915–928.
- Figueroa-Castro, P. 2009. Fluctuación poblacional y trapeo de *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal (Coleoptera:Curculionidae) con feromona de agregación en plantaciones de agave tequilero en Jalisco. Tesis de

Maestría en Ciencias. Posgrado en Protección Vegetal. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Texcoco, México. 63 p.

Franco-Islas, M.G. 2001. BIOENSAYO SOBRE LA EFECTIVIDAD DE DOS INSECTICIDAS SISTÉMICOS EN EL DESCORTEZADOR *Phlocosinus tacubayae* Hoopkins. Tesis de Ingeniero en Restauración Forestal. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Texcoco, México. 49 p.

Friedman, M.J.1990. Commercial production and development. *In*: "Entomopathogenic nematodes in biological control". (R. Gaugler and H.K. Kaya, Eds.), pp. 153-172. CRC Press, Boca Raton, FL.

Fucikovsky Z., L. 1999. Tristeza and death of *Agave tequilana* Weber var. Blue. *In*: *Proc. 10th Internacional Conference on Plant Pathogenic Bacteria*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands.

García, E. 1998. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. (Para adaptar a las condiciones climáticas de la República Mexicana). UNAM. México. p. 246.

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

Georgis, R. y Poinar, G.O. Jr. 1994. Nematodes as bioinsecticides in turf and ornamentals. Pp. 477-489. *In*: A.R. Leslie and U.S. EPA, eds. Handbook of integrated pest management for turf and ornamentals. Boca Raton, FL, CRC Press.

Georgis, R. y Hague, N.G.M. 1991. Nematodes as biological insecticides. *Pesticide Outlook* 2, 29-32.

- Georgis, R. 1992. Present and future prospects for entomopathogenic nematodes products. *Biocontrol Sci. Technol.* 2, 83-99.
- Girón, P.S., J. Ruiz-Vega, R. Pérez-Pacheco, J. A. Sánchez-García and T. Aquino-Bolaños. 2012. Isolation of entomopathogenic nematodes and control of *Phyllophaga vetula* Horn in Oaxaca, Mexico. *African Journal of Biotechnology.* 11(99), pp. 16525-16531.
- Granados, S. D. 1999. Los agaves en México. Universidad Autónoma Chapingo. México. Pp. 65-67, 149.
- González, H. H., Solís, A. J. F., Pacheco, S. C., Flores, M. F., Rubio, C. R. y Rojas, L. J. 2007. Insectos barrenadores del agave tequilero. pp 39-67. In: Manejo de plagas del agave tequilero. H. González, H., J. I. Del Real L. y J. F. Solís A. (Eds.) Colegio de Postgraduados y Tequila Sauza S. A. de C.V., Zapopan, Jalisco, México.
- Grewal, P.S., Ehlers, R.U., Shapiro-Ilan, D.I., 2005. Nematodes as Biocontrol Agents. CABI, Wallingford, UK.
- Grewal, P. S. 2000. Mushroom pest. In: Lacey and H. K. Kaya, eds. Field Manual of techniques in vertebrate pathology. L.A. Dordrecht, The Netherlands, Klower Academic publishers. 497-503.
- Halffter, G. 1957. Plagas que afectan las diferentes especies de agaves cultivadas en México. Dirección de la Defensa Agrícola. México. SAG.135 pp.
- Hara, A.R. y Kaya, H.K. 1993. Toxicity of selected organophosphate and carbamate pesticides to infective juveniles of the entomogenous nematode *Neoaplectana carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae). *Environm. Entomol.* 12: 496-501.



- Hernández-Marante, D., Folk, A., Sánchez, A. y Fernández-Esconar, R. 2003. Control del curculiónido ferruginoso de las palmeras (*Rhynchophorus ferrugineus* Olivier) mediante inyecciones al tronco y pulverización foliar. Bol. San. Veg. Plagas, 29: 563-573.
- Hominick, W. M. 2002. Biogeography. In R. Gaugler (Ed.). Entomopathogenic Nematology (pp. 115e144). Wallingford: CABI.
- Hominick, W.M., A. P. Reid, D. A. Bohan and B. R. Briscoe. 1996. Entomopathogenic nematodes - biodiversity, geographical distribution and the convention on biological diversity. Biocontrol Science and Technology, 6 (3), 317-331.
- Hominick, W.M. y Briscoe, B.R. 1990. Occurrence of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae) in British soils. Parasitol. 100, 295-302.
- Ibarra, J. E. y B. A. Federici. 1987. An alternative bioassay employing neonate larvae for determining the toxicity of suspended particles to mosquitoes. J. Am. Mosq. Control Assoc., 3: 187-192.
- ICAPET. 1999. Primer Censo de la industria del mezcal. Gobierno del Estado de Oaxaca, México. P. 40.
- Kaya, H.K. y S.P. Stock. 1997. Techniques of insect nematology. pp. 281-324. En: Lacey, L. (eds.). Manual of techniques in insect pathology. Biological Techniques Series. Capítulo VI. Academic Press, San Diego, California. 409 p.

- Kaya, H.K., Bedding, R.A. y Akhurst, R.J. 1993. An overview of insect parasitic nematodes. Pp 1-10. *In* R.A. Bedding R.J. Akhurst and H.K. Kaya, eds. Nematodes and the biological control of insect pest. East Melbourne, Australia, CSIRO Publications.
- Kaya, H.K. y Gaugler, R. 1993. Entomopathogenic nematodes. *Ann. Rev. Entomol.* 38: 181- 206.
- Kaya, H.K. y Brayton, N.A. 1987. Interaction between *Neoaplectana carpocapsae* and a granulosis virus of the armyworm *Pseudaletia unipuncta*. *J. Nematol.* 10: 350-354.
- Koppenhofer, A.M., H.K. Kaya and S.P. Taormino. 2006. Infectivity of Entomopathogenic Nematodes (Rhabditida: Steinernematidae) at Different Soil Depths and Moistures. *Journal Invertebrate Pathology* 65: 193-199.
- Koppenh fer A.M. and Parwinder S. Grewal, Eugene M. Fuzy. 2007. Differences in penetration routes and establishment rates of four entomopathogenic nematode species into four white grubs species. *Journal of Invertebrate Pathology* 94: 184-195.
- Kuwata, R., Shigematsu, M., Yoshiga, T., Yoshida, M. y Kondo, E., 2006. Phylogenetic analyses of Japanese steinernematid nematodes and their associating *Xenorhabdus* bacteria. *Japanese Journal of Nematology*, 36(2): 75-85.
- Labias, G. G. 2001. Determinación del contenido de alcoholes superiores en mezcales de palenque del Estado de Oaxaca y aspectos toxicol gicos. Tesis profesional. UABJO. Pp. 6-9. Oaxaca, Oax. México.

- Lacey, L. A. and H. K. Kaya. 2000. *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology. J. of Invertebr. Pathol.* 84:15-23.
- Lacey, L. A., R. Frutos, H. K. Kaya and P. Vail. 2001. Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future? *Biological Control* 21: 230-248.
- Lewis, E.E. and D.J. Clarke. 2012. Nematodes Parasites and Entomopathogens. In Kaya, H.K. and F.E. Vega. (Eds.) *Insect Pathology* (pp.397-398). Elsevier.
- Lewis, E.E., J. Campbell, C. Griffin, H.K. Kaya and A. Peters. 2006. Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes. *Biol. Control.* 38, 66-79.
- Lewis E.E., 2002. Behavioral Ecology. In *Entomopathogenic Nematology* (Ed. R. Gaugler). CABI International. pp. 205-225
- LeBeck, L.M., Gaugler, R., Kaya, H.K., Hara, A.H. y Johnson, M.W. 1993. Host stage suitability of the leafminer *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae) to the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae). *J. Invertebr. Pathol.* 62, 58-63.
- Leguízamo-Bermúdez, M.C. 2012. ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE *Xenorhabdus bovienii* - Poinar, SIMBIONTE DEL NEMATODO ENTOMOPARÁSITO *Steinernema feltiae* SOBRE *Fusarium spp* EN EL CULTIVO DE TOMATE – *Solanum lycopersicum L.* Tesis de Doctor en Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional De Colombia.
- Liu, J., Berry, R.E. y Moldenke, A.F. 1997. Phylogenetic relationships of entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae) inferred from partial 18S rRNA gene sequences. *J. of Invertebrate Pathology* 69: 246–252.

- López-Nuñez, J. C.; Cano, L.; Góngora-B., Carmenza E. y Stock, S. P. 2007. Diversity and evolutionary relationships of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) from the Central Andean region of Colombia. *Nematology* 9(3): 333-341.
- Lugo, G. G. 2007. Determinación de especies de gallina ciega (Coleoptera:Melolonthidae) asociadas al *Agave tequilana* Weber var. Azul en Jalisco, México. Tesis de Maestría. Colegio de postgraduados, Montecillo, Texcoco, México. 71 p.
- Luna, H. G. 2001. Hacia un manejo integrado de plagas. Fundamentos y recomendaciones prácticas. *Agave tequilana*. 2° ed. Guadalajara, Jalisco. México. 184 p.
- Mekete, T., R. Gaugler, K.B. Nguyen, W. Mandefro and M. Tessera. 2005. Biogeography of entomopathogenic nematodes in Ethiopia. *Nematropica* 35:31-36.
- Monroy. S. M., 2001. Sección celular de *Agave tequilana* Weber variedad azul para resistencia a bacterias. Centro de Investigación y Asistencia Tecnológica Y Diseño del Estado de Jalisco. A. C. (CIATEJ). Periodismo de Ciencia y Tecnología. Jalisco México p 1-3.
- Montesinos, E. 2003. Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. *Int. Microbiol.* 6: 245– 252.
- Nguyen, K.B., D.J. Hunt and R.N. Perry. 2007. Entomopathogenic Nematodes: Systematics, Phylogeny and Bacterial Symbionts. *Nematology Monographs and Perspectives*. Koninklijke Brill NV, Leiden, pp. 569-576.

- Nguyen, K.B., J. Maruniak and J.B. Adams. 2001. Diagnostic and phylogenetic utility of the rDNA internal transcribed spacer sequences of *Steinernema*. *J. Nematol.* 33, 73–82.
- Parada, J.C; Luque, Z.J.E. y Piedrahita, C., 2006. Nematodos entomoparásitos, Experiencias y Perspectivas Universidad Nacional de Colombia- Sede Bogotá. 197 p.
- Park, H. W., Kim, H. H., Youn, S. H., Shin, T. S., Bilgrami, A. L., Cho, M. R. y Shin, C. S. 2012. Biological control potentials of insect-parasitic nematode *Rhabditis blumi* (Nematoda: Rhabditida) for major cruciferous vegetable insect pests. *The Japanese Society of Applied Entomology and Zoology*. DOI 10.1007/s13355-012-0131-9.
- Pérez, D., J. F. y R. Rubio, C. 2007. Tecnología de manejo y control de plagas del agave. P. 135-168. In: Rulfo, V., F. O. *et al.*, (Ed.). Conocimiento y prácticas agronómicas para la producción de *Agave tequilana* Weber en la zona de denominación de origen del tequila. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Pacífico Centro.
- Peteira, B., Rodríguez, M., Rosales, C., Salazar, E. 2008. Uso de técnicas moleculares en la identificación de nemátodos entomopatógenos y sus bacterias simbiotes. *Rev. Pp.* 2, 16.
- Pineda, M. G. 1983. *Control químico de las plagas y enfermedades más comunes del maguey pulquero Agave atrovirens* Kart. Tesis Ing. Agr., Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Texcoco, México.
- Prychid, C.J., y Rudall, P.J. 1999. Calcium oxalate crystals in monocotyledons: a review of their structure and systematics. *Annals of Botany*. 84:725-739.

- Poinar, G.O. Jr. 1979. Nematodes for biological control of insects. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Ramírez-Choza., J. L. 1993. Max del anequén *Scyphophorus interstitialis* Gill. bioecología y control. Serie: *Libro Técnico. Centro de Investigación Regional del Sureste*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias-SARH. Mérida, Yucatán, México. p. 127.
- Renn, N. 1998. *The efficacy of entomopathogenic nematodes for controlling housefly infestations of intensive pig units. Med. Vet. Entomol. 12, 46-51.*
- Rodríguez-Del Bosque, L.A. 2012. Bases ecológicas del control biológico. En memorias del XXIII Curso Nacional de Control Biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico. Puebla, México.
- Rodríguez – Pérez, F. 2007. *Heterohabditids Bacteriophora* HC1, estrategia de desarrollo como Agente de control Biológico de Plagas Insectiles. Tesis de grado Doctor en Ciencias Agrícolas., Universidad Agraria de La Habana Cuba., Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. 113-118 p.
- Rivas T., D. 1996. Inyecciones Sistémicas en Árboles. Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Méx. 13 p.
- Rodríguez, R. H. 2011. Trampeo del picudo del agave *Scyphophorus acupunctatus* Gyll. (Coleoptera:Curculionidae) con feromonas de agregación y volátiles del agave. Tesis Doctoral. Colegio de postgraduados, Montecillo, Texcoco, México. 87 p.

- Rodríguez, G. B. 1999. La investigación en agave tequilero en el CIATEJ. In: El Agave. Bernache, P. F., Y Ávalos, C. (Eds). Gaceta informativa. 1(2). Guadalajara, Jalisco, México. P. 2-3.
- Ruíz-Montiel, C. 2003. Comunicación química de *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal (Coleopetera:Curculionidae). Tesis de Doctorado, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Edo. de México.
- Ruíz-Montiel, C., G. García-Coapio, J. C. Rojas, E. A. Malo, Cruz-López, I. del Real, y H. González-Hernández. 2008. Aggregation pheromone of *Scyphophorus acupunctatus* (Coleopetera:Curculionidae). Entomol. Exp. Appl. 127: 207-217.
- Ruiz-Vega, J., T. Aquino-Bolaños, H. K. Kaya y P. Stock. 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.
- SAGARPA, SEDAF y COMMAC. 2004. *Plan Rector del Sistema Producto Maguey-Mezcal*. Diagnóstico del Sistema Producto Maguey-Mezcal.
- SAS. 2002. Stastiscal Analysis System a los métodos estadísticos. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma de Chapingo.
- Sepúlveda-Cano, P.A., J.C. López-Núñez y A. Soto-Giraldo. 2008. Efecto de dos nematodos entomopatógenos sobre *Cosmopolites sordidus* (Coleoptera: Dryophthoridae). Revista Colombiana de Entomología 34 (1): 62-67.
- Servín, R., Tejas, A., Arce-Montoya, M. y Robert, M. L. 2006. *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal (Coleoptera: curculionidae) como Potencial Insecto-Plaga de *Yucca valida* Brandegees en Baja California Sur, México. Folia Entomológica Mexicana, 45(1): 1-7.

- Sistema Producto Coco del Estado de Jalisco A.C. 2000. Estrategia Fitosanitaria del Estado de Jalisco para el combate del mayate prieto del cocotero (*Rhynchophorus palmarum*).
- Shahina, F., X. Yan, R. Han and G. Mehereen. 2010. Identification and phylogenetic analysis of entomopathogenic nematodes (*Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*) from Pakistan as inferred from ribosomal DNA sequences of the ITS1-5.8S-ITS2 region. *J. Nematol.* 28, 75-93.
- Shapiro-Ilan, D.I., Morales-Ramos, J.A., Rojas, M.G. y Tedders, W.L. 2010. Effects of a novel entomopathogenic nematode-infected host formulation on cadaver integrity, nematode yield, and suppression of *Diaprepes abbreviatus* and *Aethina tumida*. *Journal of Invertebrate Pathology.* 103: 103-108.
- Smart, G.C.Jr. 1995. Viewpoint: Entomopathogenic nematodes for the biological control of insects. *J. Nematol.* 27(4S): 529-534.
- Solís-Aguilar, J. F. 2001. *El picudo del agave tequilero (Scyphophorus acupunctatus Gyllenhal) (Coleoptera:Curculionidae) en Jalisco, México.* Tesis Doctoral. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, México.
- Solís, A. J., H. H. González, V.J. Leyva, M. A. Equihua, H.F. Flores y A. Martínez Garza. 2001. *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal, plaga del agave tequilero en Jalisco, México. *Agrociencia* 35: 663-670.
- Sonnenberg, R., Nolte, A. y Tautz, D. 2007. An evaluation of Lsu rDNA D1-D2 sequences for their use in species identification. *Frontiers in Zoology.* 4: 112.



- Stock, S.P. y Goodrich-Blair, H. 2012. Nematode parasites, pathogens and associates of insects and invertebrates of economic importance. (Pp. 373-426). En: Lacey, L.A. (Ed.) *MANUAL OF TECHNIQUES IN INVERTEBRATE PATHOLOGY* 2da. Edición. Elsevier. 484 p.
- Stock, S.P., Campbell, J.M. y Nadler, S.A. 2001. Phylogeny of *Steinernema* Travassos, 1927 (Cephalobina: Steinernematidae) inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters. *Journal of Parasitology* **87** (4): 877-889.
- Stock, S.P., Pryor, B.M. y Kaya, H.K. 1999. Distribution of entomopathogenic nematode (*Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*) in natural habitats in California, USA. *Biodiv. Conserv.* 8: 535-549.
- Stuart, R.J., M.E. Barbercheck, P.S. Grewal, R.A.J. Taylor and C.W. Hoy. 2006. Population biology of entomopathogenic nematodes: concepts, issues, and models. *Biol. Control* 38, 80–102.
- Timper, P., Kaya, H.K. y Gaugler, R. 1988. Dispersal of the entomogenous nematode *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae) by infected adults insects. *Environ. Entomol.* 17, 546-550.
- Toledo, J., J.E. Ibarra, P. Liedo, A. Gómez, M.A. Rasgado and T. Williams. 2005. Infection of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) larvae by *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) under laboratory and field conditions. *Biocontr. Sci. Technol.*, 15: 627-634.
- Tomazini, M.D., Aguilera, M.M., Rodrigues, R.C.D., Bessi, R., Harakava, R. y de Oliveira, C.M.G. 2012. Análises Biométrica e Molecular de Isolado Brasileiro de *Rhabditis rainai* (Nematoda: Rhabditida). *Nematologia Brasileira*. Vol. 37. 8 p.

- Valdés, R. S., Ramírez, J. L., Reyes, J. y Blanco, A.. 2004. Respuestas del insecto max (*Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal) (Coleoptera:Curculionidae) hacia algunos compuestos atrayentes del henequén. Acta Zoológica Mexicana. 20: 157-166.
- Valenzuela, Z. A. G. 1997. El agave tequilero: su cultivo e industria. 2° ed. Litteris. Editores y Monsanto. Guadalajara, Jalisco. México. 204 p.
- Vázquez-Montoya, E.L. 2012. Caracterización de nematodos entomopatógenos aislados del Valle de Guasave, Sinaloa, México. Tesis de Maestría en Ciencias. Guasave, Sinaloa, México. 124 p.
- Uribe-Lorío, L., M. Mora and S.P. Stock. 2005. First record of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Costa Rica. J. Invertebr. Pathol. 88, 226–231.
- Wang, H., J. Luan, H. Dong, H. Qian and B. Cong. 2014. Natural occurrence of entomopathogenic nematodes in Liaoning (Northeast China). Journal of Asia-Pacific Entomology 17 (2014) 399–406.
- White, G. F. 1927. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. Science 66:302-303.
- Woodring, J.L. y Kaya, H.K.1988. Steinernematid and Heterorhabditid nematodos. *A handbook of biology and techniques*. Southern Cooperative Series Bulletin 331, Arkansas Agricultural Experiment Station, Fayetteville, AK. 30pp.

## ANEXO 1

### Secuencias de los nematodos aislados en suelos cultivados con agave mezcalero en los Valles Centrales de Oaxaca.

#### Secuencias de DNA ribosómico (Subunidad 28S)

Población Matatlán (N2)

```
AAAAAGAACTAACTAGGATTTCTTAGTAACTGCGAGTGAAAAGGAAAAAGCTCAGCGTCGAA
ACCAAGTTGGCTAACGTTGACTTGGTGTGACGTATAGAGGCGTTCATGTGCGGTTTGTG
ATAATGCGAATTTCTTTGACTAGGGATCCAAAGAGGGTGCTAGACCCTTACGCATTGTTGACT
TTTCGTACGCGTTTCGTTTCTTGGAGTAGGGTTGTTTTGGATCGCAGCCCAAAGTAGGTGGTATA
CTTCATCTAAAGCTAAATACGACTACGAATCCGATAGCAAACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTGC
AAAGTACTTTGAAGAGAGAGTTCAAGAGGACGTGAAACCGGTAGGGTGGAAGCAGATAAAGTT
GACGAACGTGTGTCGTATTCAGAACTACAATTTGTGGTTTGTTTTTACGATCGATGTGGGCTGG
CGTCTTTGGTTAACTTAGTGTCTGGCGGCAATGGTGACCCTGCGGAGGGATACTCGGTTGTCC
TGCGATGCTTGGTATGGCTAGAGGTTGCTGGTTTTATAGTCATCGCTTTATCTGACCCGTCTT
GAAACACGGACCAAGGAGTGTACCGCTTACGCGAGTCTTAGAGTGTGTCAAACTTTGAGGCG
TAACGAAAGTAAATGTGGATTTATTCAGTACTGACTTGGGATACGTTGTCTTTTTGGATAGCGTTG
GACCATGGTTTTATCGTAATCGCTTGCATGCGGTGAAAATAGAGCGTAAGCGGTGCGACCCG
AAAGATGGTGAATATGCCTGAGCAGGATGAAGCCGGAGGAACTCTGGTGGAAGTCCGAAG
CGGTTCTGACGTGCAAATCGATCGTCTGACTTGGGTATAGGGGCGAAAGACTAATCGAACCAT
CT
```

*Steinernema websteri*

Cobertura: 98%

Identidad: 100%

Población San Juan Guelavía (N5):

ACTAGGATTCCCAAAGTAACGGCGAGTGAAGTGGGAAGAGCCCAGCGCTGAATCGCTCAGTC  
TTAGGCTGCTGCGAATTGTAGCGTATAGGTCTAGTATTTCCGTAGTGGTTGTTGCTCGAAGTCC  
CTTTGACAGGGGCCACAGTCCTGAGAGGGTGAAGACCCGTCCGAGCACGGCCTCAGCGGA  
TATCGCTGGTCCTTGGAGTCGGGTTGCTTGAAAGTGCAGCCTTAAGTCGGTGCTAACTTCAT  
CTAAGGCTAAATATAGCTACGAATTCGATAGCAAACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTGCAAAGA  
ACTTTGAAGAGAGAGTTCAAGAGAACGTGAAAACACATGAGTGGAAAGCGGAAAGAGTTGACAT  
AACCCGGTAGCTAAGTTGTATGTGCACGCTATTGTGTGTACGTTAGATGGATGCTGCTTATGGT  
TGCGCCGATAGCGTCGGTGGTGCTTGCTGACCCGTGTAGTGTGGCCACATCTGTGGTGTCTT  
GCTTGCGGTTAGGTTAGTCACTGGTGGCGTTTGTGCTGAGTATCGGTGTGAACG  
TCAATCACCTTTCCGGCCCGTCTTGAAACACGGACCGAGGAGTGTAACTTGTACGCGAGTCAG  
AGGGTGGCAAACCCAACGGCGAAATTAACGTAAAGGTCGGTTAACCGACTGACATAGGATCC  
GGTTTACCGGCGCACTATGGCCCTGTCTTGGATGCTTGCATCTGGGCAGAGGAAGAGCGTAC  
AGGTTGCGACCCGAAAGATGGTGAAGTATGCTTGAGCAGGACGAAGCCAGAGGAACTCTGG  
TGGAAGTCCGTATCGGTTCTGACGTGCAAATCGATCGATAGACTTGAGTATAGGGGCGAAAGA  
CTAATCGAACCATCTAG

*Rhabditis rainai*  
Cobertura: 95%  
Identidad: 100%

#### Secuencias de DNA (Región ITS)

Población San Juan Guelavía (N3):

TTTGATTACNNTTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTGCCTGCCCGGGACTGAGTTGTTTC  
GAGAAAAGCGGAGATTGCGATGTTGAACGTTTTTCGGACGGTCTTTGTTGCGAGAACC GCGTTA  
ATCGAATCGGCTTGAACCGGGCAAAGTGCCTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAG  
GATCATTATTGAGCTAATATTTTCTTTTTAATCAAGTTTTCGCTGTTTCGTTTCTAAGCTTTAACT  
TGATCTCTAACGGCTTTGAAAGGTTTCTACAGATGTTTGGAGCAGTTGTATGAGCGTGACTGTG  
CTGATGAACATTGTACATTGTTATCTAAGCGTTTTCGTCGTTTCTTGAATGCTTAGTGATGAGAAT  
TAAAGAGGCTGCTGACTCGCCATTCTTTGATTGCTAACAAAACGTTTTGTTTCGATAATTGTG  
TCACTCGTTGATGCATTTTTAATTATCAAGTCTTATCGGTGGATCACTCGGTTTCGTAGGTGAT  
GAAAACGGGGCAAACCGTTATTTGGCGTGAATTGCAGACATATTGAGCGCTAAAATTTTGA  
ACGCAAATGGCACTAACAGGTTTTATCTGTTAGTATGTTCAATTGAGGGTCTTTTGACTAGAAT  
CTGGCAATCGGCTGTGATTGCTTTTTCGGTAAGCTACTTTGCTTTTGTGAAGTACCTTTTCGGT  
ATGGCTATTTGATTGTCTAATGGATGTCTGGCTAGCTGTTTCTTTGCTAGACGTCTGCAATCATT  
TGGCATTGCGTAGTGTGTTGATTAATGGTTTAGCGCGTTTCTTGCTAACTGACTTTTACACAAGC  
AAGTGTAATACGTTTCTTAAAGTCAGCTCATTAAATCAATGTGGTTTTCTGACTTGATTTGTCGGT  
CAATTGTGCTATGCTCTGCTAATCTTTTTCGAACTAGACCTCAATTTGAGCAAGATTACCCGCTG  
AACTTAAGCATATCAGTAAGCGGAGGAAAAGAACTAACTAGGATTTCTTAGTACGG

*Steinernema carpocapsae*  
Cobertura: 96%  
Identidad: 100%

Población Cuilapam (N6):

CTTTTACACACCGCCCGTGCCTGCCCGGGACTGAGTTGTTTCGAGAAAAGCGGAGATTGCGAT  
GTTGAACGTTTTTCGGACGGTCTTTGTTGCGAGAACC GCGTTAATCGAATCGGCTTGAACCGGG  
CAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAGCTAATATTTT

CCTTTTTAATCAAGTTTTCGCTGTTTCGTTTCTAAGCTTTAACTTGATCTCTAACGGCTTTGAAAG  
GTTTCTACAGATGTTTGGAGCAGTTGTATGAGCGTGACTGTGCTGATGAACATTGTACATTGTT  
ATCTAAGCGTTTCGTCGTTTCTTGAATGCTTAGTGATGAGAATTAAGAGGTCTGCTGACTCGC  
CATTCTTTGATTGCTAACAAAAACGTTTTGTTTCGATAATTGTGTCACTCGTTGATGCATTTTTTA  
ATTATCAAGTCTTATCGGTGGATCACTCGGTTTCGTAGGTTCGATGAAAAACGGGGCAAAAACCG  
TTATTTGGCGTGAATTGCAGACATATTGAGCGCTAAAATTTGAACGCAAATGGCACTAACAGG  
TTTTTATTTGTTAGTATGTTCAATTGAGGGTCTTTTGACTAGAATCTGGCAATCGGCTGTGATTG  
CTTTTTCGGTAAGCTACTTTGCTTTTGTGAAGTACCTTTTCGGTATGGCTATTTGATTGTCTAAT  
GGATGTCTGGCTAGCTGTTTCTTTGCTAGACGTCTGCAATCATTGGCATTGCGTAGTGTTTGA  
TTAATGGTTTAGCGCGTTTCTTGCTAACTGACTTTTACACAAGCAAGTGTAAATACGTTTCTTAAA  
GTCAGCTCATTAAATCAATGTGGTTTTCTGACTTGATTTGTGCGTCAATTGTGCTATGCTCTGCTA  
ATCTTTTCGAACTAGACCTCAATTTGAGCAAGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAGTAAGC  
GGAGGAAAAGAACTAACTAGGATTTCTTA

*Steinernema carpocapsae*  
Cobertura: 99%  
Identidad: 99%

Población Zaachila (N12):

TGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTGCCCGGGACTGAGTTGTTTCGAGAAAAGCGGAGATT  
GCGATGTTGAACGTTTTCGGACGGTCTTTGTTGCGAGAACC GCGTTAATCGAATCGGCTTGAA  
CCGGGCAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAGCTAA  
TATTTTCCTTTTTAATCAAGTTTTCGCTGTTTCGTTTCTAAGCTTTAACTTGATCTCTAACGGCTTT  
GAAAGGTTTCTACAGATGTTTGGAGCAGTTGTATGAGCGTGACTGTGCTGATGAACATTGTACA  
TTGTTATCTAAGCGTTTCGTCGTTTCTTGAATGCTTAGTGATGAGAATTAAGAGGTCTGCTGA  
CTCGCCATTCTTTGATTGCTAACAAAAACGTTTTGTTTCGATAATTGTGTCACTCGTTGATGCAT  
TTTTTAATTATCAAGTCTTATCGGTGGATCACTCGGTTTCGTAGGTTCGATGAAAAACGGGGCAAA  
AACCGTTATTTGGCGTGAATTGCAGACATATTGAGCGCTAAAATTTGAACGCAAATGGCACTA  
ACAGGTTTTTATTTGTTAGTATGTTCAATTGAGGGTCTTTTGACTAGAATCTGGCAATCGGCTGT  
GATTGCTTTTTTCGGTAAGCTACTTTGCTTTTGTGAAGTACCTTTTCGGTATGGCTATTTGATTGT  
CTAATGGATGTCTGGCTAGCTGTTTCTTTGCTAGACGTCTGCAATCATTGGCATTGCGTAGTG  
TTTGATTAATGGTTTAGCGCGTTTCTTGCTAACTGACTTTTACACAAGCAAGTGTAAATACGTTTC  
TTAAAGTCAGCTCATTAAATCAATGTGGTTTTCTGACTTGATTTGTGCGTCAATTGTGCTATGCTC  
TGCTAATCTTTTCGAACTAGACCTCAATTTGAGCAAGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAGT  
AAGCGGAGGAAAAAACTAACTAGGATTTCTTANNACG

*Steinernema carpocapsae*  
Cobertura: 98%  
Identidad: 99%

## ANEXO 2

### Aplicación de nemátodos entomopatógenos mediante endoterapia

