



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA**

**Determinación y reproducción de nematodos con  
potencial biocontrolador de descortezadores  
(Curculionidae: Scolytinae) en Querétaro y  
Aguascalientes**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**B I Ó L O G A**

**P R E S E N T A :**

**GABRIELA ISLAS LÓPEZ**



**DIRECTORA DE TESIS:  
Dra. Adriana Rosalía Gijón Hernández  
Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en  
Conservación y Mejoramiento de Ecosistemas  
Forestales del INIFAP**

**Diciembre 2016**

**Ciudad de México**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Sanidad Forestal del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Conservación y Mejoramiento de Ecosistemas Forestales del Instituto de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) dentro del proyecto de investigación “Generación de nuevas estrategias de monitoreo y control de los insectos descortezadores *Dendroctonus mexicanus*, *Dendroctonus frontalis* e *Ips lecontei*, mediante el uso de semioquímicos y entomopatógenos” con N° de Proyecto SIGI 16433532511. (Año 2014-2016), bajo la dirección de la Dra. Adriana R. Gijón Hernández.



*Hay hombres que luchan un día y son buenos,  
Hay otros que luchan un año y son mejores,  
Hay quienes luchan muchos años y son muy buenos,  
Pero hay los que luchan toda la vida, esos son los  
imprescindibles.*

**Bertolt Brecht**

## *AGRADECIMIENTOS*

*A la Universidad Nacional Autónoma de México, que me abrió sus puertas desde el CCH hasta mi formación profesional en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Por permitirme tener el orgullo de ser universitaria, que más que un título es una forma de vida.*

*Al INIFAP, por el financiamiento para la realización de esta investigación.*

*A la Dra. Adriana Gijón Hernández por brindarme su apoyo, paciencia, dedicación y por transmitirme sus conocimientos durante la asesoría de este trabajo.*

*A mis revisores: M. en C. Dolores Alicia Escorza Carranza, M. en C. Marisela Valdés Ruiz, Biól. Roberto Cristóbal Guzmán y en especial a la Biól. María Magdalena Ordóñez Reséndiz por sus sugerencias y apoyo incondicional brindado en la realización de este trabajo.*

*Al Dr. Cristian Nava Díaz por brindarme su amistad, sus conocimientos, valiosos comentarios y por facilitarme el acceso a las instalaciones del Colegio de Posgraduados.*

*Al maestro Juventino Rosas por sus valiosos conocimientos en nematología.*

*A la jefa de la unidad de microscopía electrónica del Colegio de Posgraduados, la Dra. Hilda A. Zavaleta y al biólogo Simón por su apoyo y tiempo en la obtención de imágenes de barrido de los especímenes.*

*Al Dr. Víctor López Gómez por el apoyo en el procesamiento de los datos.*

*Al Ingeniero Leonel Rosas por su amistad, por contribuir a mi formación académica no solo durante mi estancia en SENASICA sino hasta ahora. Gracias por los valiosos conocimientos y sugerencias que enriquecieron el presente trabajo.*

*Al biólogo San Marino Cid por brindarme su apoyo incondicional, paciencia, por sus palabras de aliento y confianza. Gracias por la colaboración en la identificación y toma de fotografías de los descortezadores.*

*A la ingeniera Iris Pérez por brindarme su amistad, apoyo incondicional y por los gratos momentos.*

## DEDICATORIA

*A mi madre por darme la vida, ser mi apoyo incondicional, por ser mi guía en todos los retos que se me han presentado, pero sobre todo por todo el amor que me das. Me has educado para ser una persona comprometida y a salir adelante a base de trabajo y esfuerzo. Este logro es para tí.*

*A mi padre por ser mi apoyo en todas las etapas de vida, por ser la base que forjo la persona que soy ahora. Gracias por tu amor. Este logro es para tí, espero que te sientas orgulloso porque voy por más.*

*A mis hermanas Gissele y Caro por darle valor al tiempo, otorgándome segundos, minutos y horas compartidas en alegrías, retos, logros y cariño.*

*A tí, por todos los maravillosos momentos que hemos compartido juntos, por el amor que nos tenemos y por tu absoluto apoyo en los momentos más difíciles de mi vida, Gracias Marino, te amo.*

*A mis amigos de la Fes, Ale Lili, Sole, Jocelín, Ale Eli, Shaíd, César y a tí, mi amigo incondicional desde el CCh, Mike, les agradezco por esos bellos momentos que hemos pasado juntos, y por todo lo que me han enseñado. Gracias por brindarme tan valiosa amistad, los quiero.*

*A mis amigos del INIFAP, Iris, Brenda, Zitla, Cíndy y al Biólogo Francisco por hacer más amena mi estancia en el INIFAP, los momentos que pasamos y por los consejos que me brindaron para sacar mi trabajo adelante.*

# CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS .....	III
DEDICATORIA.....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
ÍNDICE DE CUADROS.....	IX
RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1. Los bosques en México .....	4
2.2. Generalidades sobre los descortezadores .....	4
2.3. Especies de descortezadores en México.....	5
2.3.1. <i>Dendroctonus frontalis</i> Zimmermann .....	6
2.3.2. <i>Ips lecontei</i> Swaine.....	8
2.4. Métodos de control de los descortezadores .....	9
2.4.1. Control legal.....	9
2.4.2. Control con semioquímicos.....	11
2.4.3. Control biológico.....	11
2.5. Nematodos entomopatógenos .....	13
2.5.1. Morfología .....	14
2.5.2. Ciclo de vida .....	16
2.5.3. Taxonomía .....	17
2.5.4. Bacterias simbiotes.....	18
2.5.5. Ecología .....	18
2.6. Nematodos entomopatógenos en México .....	19
2.7. Cultivo de nematodos entomopatógenos.....	20
3. OBJETIVOS .....	22
4. ÁREA DE ESTUDIO.....	23
4.1. Estado de Querétaro .....	23
4.2. Estado de Aguascalientes .....	24
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	25
5.1. Selección de sitios de muestreo .....	25
5.2. Muestreo de suelo .....	26
5.3. Cría de <i>Galleria mellonella</i> .....	26
5.4. Aislamiento de nematodos entomopatógenos de suelo .....	27
5.5. Aislamiento de nematodos entomopatógenos por inspección directa .....	28

5.6.	Identificación taxonómica.....	28
5.6.1.	Montajes temporales.....	29
5.6.2.	Montajes permanentes.....	29
5.6.3.	Microscopia electrónica de barrido.....	30
5.7.	Identificación molecular.....	31
5.7.1.	Extracción de ADN.....	31
5.7.2.	Amplificación de ADN.....	31
5.7.3.	Electroforesis.....	32
5.7.4.	Secuenciación de los productos de PCR.....	32
5.7.5.	Edición de secuencias.....	33
5.7.6.	Análisis filogenético.....	33
5.8.	Pruebas de patogenicidad <i>in vitro</i> de los aislamientos de nematodos sobre insectos descortezadores.....	33
5.9.	Reproducción de nematodos <i>in vitro</i> .....	34
5.9.1.	Conteo de nematodos.....	35
6.	RESULTADOS.....	36
6.1.	Aislamiento de nematodos entomopatógenos.....	36
6.2.	Identificación taxonómica.....	37
6.2.1.	Descripción de las cepas TMA2, CGA7 y GMA6.....	37
6.2.2.	Descripción de la cepa MMO9.....	46
6.2.3.	Descripción de la cepa AS116.....	51
6.3.	Identificación molecular.....	55
6.4.	Diagnosis.....	59
6.5.	Pruebas de patogenicidad <i>in vitro</i> de los aislamientos de nematodos sobre insectos descortezadores.....	60
6.6.	Reproducción de nematodos <i>in vitro</i> .....	62
7.	DISCUSIÓN.....	65
7.1.	Aislamiento de nematodos entomopatógenos.....	65
7.2.	Diagnosis.....	65
7.3.	Pruebas de patogenicidad <i>in vitro</i> de los aislamientos de nematodos sobre insectos descortezadores.....	67
7.4.	Reproducción de nematodos <i>in vitro</i> .....	70
8.	CONCLUSIONES.....	73
9.	LITERATURA CITADA.....	74
	ANEXO 1. Glosario.....	86



# ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Vista lateral de *Dendroctonus frontalis*, colectado en la Sierra Gorda de Querétaro.....6
- Figura 2.** Vista lateral de *Ips lecontei*, colectado en la Sierra Gorda de Querétaro.....8
- Figura 3.** Fuste de *Pinus patula*. (a) Grumos de resina, síntoma de ataque por descortezador. (b) Cambium vascular con presencia de galerías hechas por insectos descortezadores.....26
- Figura 4.** Trampa White, consiste en placas Petri y papel filtro que permiten el desplazamiento activo de los nematodos hacia el agua para poder cosecharlos.....28
- Figura 5.** Región anterior (a y c) y posterior (b y d) de un macho de la cepa TMA2. (a) Estoma ancho con un diente dorsal, esófago típico rhaditoide, (b) Vista lateral de la espícula y gubernáculo, (c) Abertura del estoma, seis papilas labiales, (d) papilas genitales.....38
- Figura 6.** Primera generación de la cepa TMA2 en microscopía de luz. (a) región cefálica de hembra proyectándose el estoma, un diente dorsal y bulbo esofágico, (b) Región anterior, vista lateral de la vulva.....39
- Figura 7.** Hembra de *Pristionchus americanus* cepa TMA2 en microscopía electrónica de barrido (a) Región anterior mostrando la distribución de papilas. (b) Poro excretor. (c) Región posterior mostrando ano y (d) Región posterior mostrando la cola en forma de látigo.....40
- Figura 8.** Región anterior de un macho de la cepa CGA7 (a y c). Región posterior (b y d). (a) Papilas labiales, (b) Disposición de papilas genitales, (c) Estoma y esófago típico de *P. americanus*, (d) Vista lateral de la espícula y el gubernáculo.....41
- Figura 8.** Hembra de la cepa CGA7 en microscopía electrónica de barrido de. (a) Papilas labiales, (b) Poro excretor, (c) vulva, (d) Vista ventral de la región posterior se observa el ano y la cola en forma de látigo.....42
- Figura 9.** Región anterior (a y c), región posterior (b y d). (a) Papilas labiales y apertura del estoma, (b) Papilas genitales, (c) Esófago típico con procorpus, metacarpus y poscorpus, (d) Vista lateral de la espícula y gubernáculo en forma de hoz, cola alargada.....43
- Figura 10.** Microscopía electrónica de barrido. (a) Región cefálica con seis papilas cefálicas y apertura anfidial elíptica, (b) Poro excretor, (c) Vulva y estriación longitudinal, (d) Vista ventral del ano.....44
- Figura 11.** Macho de la cepa MMO9 en microscopía de luz. (a) Región anterior con seis papilas labiales, procrpus. (b) Metastoma con diente y dentículo. (c) Región posterior, espícula en forma de “Y”, gubernáculo en forma de reja del arado y cola conoide y alargada.....47
- Figura 12.** Microscopía electrónica de barrido de hermafrodita de la cepa MMO9. (a). Región cefálica con seis papilas cefálicas, (b) Cutícula con estrías y poro excreto, (c) Vista lateral del ano, (d) Cola conoide.....48

<b>Figura 13.</b> Hermafrodita de la cepa MMO9 en microscopia de luz (a) Región anterior, esofago y estoma similar al macho. (b) Región vulvar. (c) ano (d) Cola conoide.....	<b>49</b>
<b>Figura 15.</b> Macho de la cepa AS116 en microscopía electrónica de barrido. (a) Región cefálica con presencia de bacterias, (b) Vista lateral de la espícula.....	<b>51</b>
<b>Figura 16.</b> Macho de la cepa AS116 en microscopia electrónica de barrido. (a) Estoma asimétrico y procorpus muscular, (b) Testículo reflejado, (c) Vista lateral de la espícula y el gubernáculo.	<b>52</b>
<b>Figura 17.</b> Hembra de la cepa AS116 en microscopia de luz (a) Región anterior, estoma tubular asimétrico, estoma tipo rhaditoide, (b) Vista ventral de la vulva, (c) Región posterior con vista ventral del ano y el hinchamiento postanal.....	<b>53</b>
<b>Figura 18.</b> Hembra de la cepa AS116 en microscopia electrónica de barrido. (a) Región anterior con seis papilas cefálicas, ((b) región posterior en forma de cúpula con mucrón.....	<b>53</b>
<b>Figura 19.</b> Amplificación del producto de PCR. Marcadores moleculares (1 kb y 100pb), (1) Cepa TMA2 <i>Pristionchus americanus</i> , (2) Cepa CGA7 <i>Pristionchus americanus</i> , (3) Cepa MMO9 <i>Diplogasteroides magnus</i> , (4) Cepa GMA6 <i>Pristionchus americanus</i> y (5) Cepa AS116 <i>Rhabditoides regina</i> .....	<b>55</b>
<b>Figura 20.</b> Árbol filogenético de las cepas TMA2, CGA7 y GMA6 obtenido del análisis de la región 18S. Los aislamientos obtenidos en este estudio se muestran en negritas.....	<b>57</b>
<b>Figura 21.</b> Árbol filogenético de la cepa MMO9 obtenido del análisis de la región 18S.....	<b>58</b>
<b>Figura 22.</b> Árbol filogenético de la cepa AS116 obtenido del análisis de la región 28S.....	<b>58</b>
<b>Figura 14.</b> Efecto de las especies de nematodos sobre la mortalidad de <i>D. frontalis</i> . Letras diferentes denotan diferencias significativas $P(0.001)$ .....	<b>61</b>
<b>Figura 15.</b> Efecto de las diferentes especies de nematodos sobre la mortalidad de <i>D. frontalis</i> respecto al tiempo. En donde se comparten letras iguales no hay diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ( $P<0.001$ ).....	<b>61</b>
<b>Figura 25.</b> Efecto de la especie de nematodo sobre el número de nematodos de cada tratamiento. Donde se comparten letras iguales no hay diferencias significativas ( $P<0.001$ ).....	<b>63</b>
<b>Figura 26.</b> Efecto del tratamiento en el número de nematodos en relación al tiempo y a la especie. Letras diferentes denota diferencias significativas ( $P <0.001$ ).....	<b>64</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Ubicación geográfica y nombre del predio donde se recolectaron las muestras para el aislamiento de nematodos entomopatógenos en Querétaro.....	<b>23</b>
<b>Cuadro 2.</b> Ubicación geográfica y nombre del predio donde se recolectaron las muestras para el aislamiento de nematodos entomopatógenos en Aguascalientes.....	<b>24</b>
<b>Cuadro 3.</b> Aislamientos de nematodos de Querétaro y Aguascalientes.....	<b>36</b>
<b>Cuadro 4.</b> Características morfométricas para las cepas TMA2, CGA7 y GMA6 (en $\mu\text{m}$ ).....	<b>45</b>
<b>Cuadro 5.</b> Características morfométricas para la cepa MMO9 (en $\mu\text{m}$ ).....	<b>50</b>
<b>Cuadro 6.</b> Características morfométricas para la cepa AS116 (en $\mu\text{m}$ ).....	<b>54</b>
<b>Cuadro 7.</b> Información de las secuencias de mayor alineación del NCBI con las cepas de nematodos aisladas.....	<b>56</b>
<b>Cuadro 8.</b> Resultados del modelo lineal generalizado con distribución cuasibinomial que prueba el efecto del tiempo, especie de nematodo y su interacción (tiempo $\times$ especies de nematodo) sobre la mortalidad de <i>Dendroctonus frontalis</i> .....	<b>60</b>
<b>Cuadro 9.</b> Resultados del modelo lineal generalizado con distribución Poisson que prueba el efecto del medio, medio, especie, tiempo y las interacciones medio $\times$ especie de nematodo, medio $\times$ tiempo, especie $\times$ tiempo y medio $\times$ especie $\times$ tiempo sobre la reproducción de nematodos.....	<b>62</b>

## RESUMEN

Los bosques se encuentran en continuo deterioro ambiental, el cambio climático, junto con otros factores de presión, influye en la presencia de brotes de plagas importantes como los descortezadores. De acuerdo con la NOM-019 SEMARNAT-2006 las especies son controladas con el derribo - descortezado de los árboles afectados y el empleo de insecticidas que pueden ser nocivos para el ambiente. Por lo anterior el objetivo del presente estudio fue identificar nematodos nativos con potencial para el control biológico del complejo de insectos descortezadores en la Sierra Gorda de Querétaro y en la Sierra Fría de Aguascalientes. En abril de 2014 y septiembre de 2015, se realizaron muestreos de suelo para el aislamiento de nematodos entomopatógenos. El aislamiento se realizó con larvas de *G. mellonella* como insectos trampa. Para la identificación taxonómica se usaron claves para género y morfometría para especie, así mismo se determinó molecularmente. Se realizaron las pruebas de patogenicidad de los nematodos aislados sobre adultos de *Dendroctonus frontalis*. Para determinar la mortalidad de los adultos de *D. frontalis*, se utilizó el Modelo Lineal Generalizado (GLM) con distribución cuasibinomial. También se evaluaron tres medios de cultivo para la reproducción de los nematodos aislados. Se aislaron un total de cinco poblaciones de nematodos, identificadas como *Pristionchus americanus* (cepas TMA2, CGA7, GMA6) y *Diplogasteroides magnus* (cepa MMO9) aisladas de la Sierra Gorda de Querétaro y *Rhabditis regina* (cepa AS116) aislada de la Sierra Fría de Aguascalientes. Se encontró que *Rhabditis regina* (AS116) ocasionó una mortalidad acumulada del 98%, *Pristionchus americanus* (GMA6) 95%, *P. americanus* (CGA7) 92%, *P. americanus* (TMA2) 87% y *Diplogasteroides magnus* (MMO9) 33%. Los tres medios permitieron la reproducción de los nematodos, destacándose la variante con carne para perro Cesar®, que evidenció que una fuente combinada de ácidos grasos y carbohidratos favoreció la reproducción. Las cepas GMA6 y AS116 son nematodos entomopatógenos con potencial para el control biológico de descortezadores.

# 1. INTRODUCCIÓN

México es considerado un país megadiverso debido a que su situación geográfica, topografía y climas, factores esenciales para la existencia de numerosos ecosistemas. La superficie territorial del país es de 196.4 millones de hectáreas, de la cual una gran parte tiene potencial forestal (Camacho, 2012). De acuerdo con la FAO (2008) se estima que el país cuenta con 33.5 millones de hectáreas de bosques, los cuales son ecosistemas muy importantes debido a que producen grandes cantidades de madera y proveen de servicios ambientales, como suministro de agua, retención de suelos, captura y almacenamiento de carbono, además es hábitat de muchas especies (Durán y Poloni, 2014).

Este tipo de ecosistemas es frecuentemente afectado por plagas y enfermedades, una de las plagas más importantes desde el punto de vista económico lo constituye el grupo de insectos descortezadores (Iñiguez, 1999). Los descortezadores se alimentan del cambium (tejido a partir del cual crecen los árboles), floema y la porción externa del xilema, provocando frecuentemente la muerte de árboles debilitados y sanos (CONAFOR, 2015). Dentro de los insectos descortezadores se encuentran los géneros *Dendroctonus* Erichson e *Ips* De Geer que son las principales plagas de los bosques de coníferas (Rivera *et al.*, 2009).

A partir de 2012 la actividad de insectos descortezadores se ha incrementado en varios estados de la República Mexicana, entre ellos Querétaro y Aguascalientes, posiblemente derivado del cambio climático. En la Sierra Gorda de Querétaro, decretada como área natural protegida (ANP), se registró una superficie de 5441 ha afectadas por insectos descortezadores en 2012 (CONAFOR, 2013). La Sierra Fría de Aguascalientes, también decretada como ANP, durante 2012 se documentó una superficie afectada por *Dendroctonus* de 1972 ha en bosques de pino (SEMARNAT, 2013). El grado de afectación ha implicado el uso de técnicas como derribo de árboles infestados y aplicación de insecticidas, procesos regulados por la Norma Oficial Mexicana NOM-019-SEMARNAT-2006 (SEMARNAT, 2008). Sin embargo, estas técnicas de saneamiento causan daños en el ecosistema, contaminación de suelos y mantos acuíferos; además, el uso excesivo de insecticidas químicos con el tiempo desarrolla la resistencia de los insectos, los cuales además tienen efectos desfavorables sobre insectos benéficos, vida silvestre y la salud humana (Arredondo, 1999). En respuesta a esta problemática se busca generar nuevas alternativas que permitan cuidar el estado sanitario del bosque en forma integrada.

El control biológico de insectos plaga ofrece una importante opción para evitar los problemas causados por los insecticidas debido a que mantienen en niveles tolerables a los agentes destructores mediante el uso planificado y armónico de tácticas y estrategias preventivas, supresoras o reguladoras que son ecológica y económicamente eficientes además de socialmente aceptables (Coulson, 1981).

En la actualidad se están desarrollando nuevas tecnologías con gran potencial para el control de insectos que se basan en la búsqueda de enemigos naturales como virus, bacterias, hongos y nematodos (Campos-Herrera, 2006). A los nematodos se les ha atribuido potencial para convertirse en uno de los principales agentes de control biológico, generando gran interés debido a los éxitos conseguidos en su utilización contra las plagas de insectos (García, 1994). Existen un gran número de asociaciones entre nemátodos e insectos, abarcando desde la foiesis hasta el parasitismo, este último tiene efectos perjudiciales para el hospedante (Vázquez, 2012). Se conocen más de 30 familias de nematodos que parasitan a casi todos los órdenes de insectos, de las cuales sólo siete han sido los principales objetivos de la investigación de control biológico, Mermithidae, Allantonematidae, Neotylenchidae, Sphaerularidae, Rhabditidae, Steinernematidae y Heterorhabditidae. Los representantes de las dos últimas familias, han sido el foco principal de los programas de control (Lacey, 2000), ya que, ocasionan diversos efectos en los insectos que parasitan, en algunos casos esterilidad, reducción de fecundidad, longevidad y actividad de vuelo, retardan el desarrollo y originan cambios de comportamiento, morfológicos y fisiológicos (Kaya y Gaugler, 1993).

El uso de estos nemátodos requiere una identificación apropiada de las especies nativas debido a que la supervivencia, virulencia y potencial reproductivo son características que dependen de la especie e incluso de la población, estando además influenciadas por las condiciones ambientales (Campos-Herrera, 2006), por ello el aislamiento e identificación de poblaciones autóctonas adaptadas a condiciones locales es considerado una parte esencial dentro de los estudios encaminados a su uso como agentes de biocontrol (Bedding, 1990). Con ello se evitan desequilibrios ecológicos que pudieran ocasionarse al introducir nematodos foráneos que podrían afectar otros organismos del suelo o desplazar parcial o totalmente a los nematodos autóctonos (Millar y Barbercheck, 2001). Por tal motivo, la presente investigación tuvo como principal objetivo identificar nematodos nativos con potencial para el control biológico del complejo de insectos descortezadores en la Sierra Gorda de Querétaro y en la Sierra Fría de Aguascalientes.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Los bosques en México

México es reconocido como megadiverso debido entre otros factores a la convergencia de las regiones Neártica y Neotropical, cuyo resultado es una mezcla compleja de elementos bióticos (Morrone, 2005).

Los bosques de México son de los más ricos en especies del género *Pinus*, poseen más del 42% de las especies reportadas a nivel mundial (Sánchez, 2008), representan un recurso valioso debido a su alto valor ecológico (Cantú y González, 2002) y a los servicios ambientales que proveen. Este tipo de vegetación abarca diferentes ambientes ecológicos de la República Mexicana y su distribución altitudinal va de los 500 hasta los 4000 metros (Rodríguez *et al*, 2010).

Los bosques se encuentran en continuo deterioro ambiental debido a múltiples factores como la tala ilegal (SEMARNAP, 1998), cambios de uso de suelo, fundamentalmente a causa de actividades agropecuarias (SEMARNAP, 1999), incendios forestales, construcción de caminos (INE, 1993) y ganadería (Cayuela, 2006).

Las plagas y enfermedades son otro factor de presión que producen daños considerables en este tipo de vegetación (SARH, 1994). Particularmente los insectos, que desde el punto de vista ecológico desempeñan una fuerte influencia al permitir el reciclaje de nutrientes, la sucesión ecológica, el tamaño, así como la distribución y abundancia de los bosques (Fettig *et al.*, 2007). Pero desde el punto de vista antropocéntrico, géneros como *Dendroctonus* e *Ips* se encuentran entre las plagas más importantes de los bosques de coníferas (Camacho, 2012).

### 2.2. Generalidades sobre los descortezadores

Tradicionalmente Scolytidae Latreille se encontraba dentro de la superfamilia Curculionoidea y se dividía en dos subfamilias Hylesininae y Scolytinae, con 25 tribus, 182 géneros y alrededor de 6000 especies (Arrieta y Atkinson, 1992). Actualmente este grupo se reconoce como la subfamilia Scolytinae y se ubica dentro de Curculionidae (Bouchard *et*

al., 2011). En México se han documentado 842 especies y 85 géneros (Ordóñez-Reséndiz *et al.*, 2008).

Este grupo de insectos se alimenta de los diferentes tejidos de las plantas (xilema, floema y médula de ramas), por lo que se les conoce como escarabajos descortezadores o barrenadores (Atkinson *et al.*, 1986) o bien, descortezadores o ambrosiales (Borrer, 1989).

Se trata de un grupo de coleópteros estrechamente ligado a las masas forestales, pues representan la primera etapa en el reciclaje de la madera muerta o bien pueden encontrarse sobre árboles en estado de deficiencia fisiológica debida a la sequía, daños de lepidópteros defoliadores o por incendios. Algunas especies de escolitinos son muy destructivas, pues atacan árboles sanos y están consideradas como una gran amenaza para los bosques de coníferas (López *et al.*, 2007).

Los géneros *Dendroctonus*, *Ips*, *Scolytus*, *Phloeosinus* y *Pseudohylesinus* son capaces de matar árboles vivos de pino, cedros y oyameles. Además, la subfamilia también incluye plagas de árboles frutales y ornamentales (Atkinson *et al.*, 1986; Arrieta y Atkinson, 1992).

### 2.3. Especies de descortezadores en México

Las infestaciones causadas por descortezadores ocasionan una significativa mortalidad del arbolado, lo que disminuye la superficie forestal, y esto tiene consecuencias económicas para los habitantes de zonas rurales y para el sector forestal en México (Salinas *et al.*, 2010). Los tres géneros de escolitinos de mayor importancia económica para nuestro país son *Dendroctonus*, *Scolytus* e *Ips* (Domínguez *et al.*, 2008).

Las infestaciones por descortezadores en bosques de pino, tienen registros desde 1910 a partir de los estudios de Alfonso Herrera, pero no es sino hasta 1969 cuando se inició el estudio y combate formal de plagas como respuesta a los daños causados por el género *Dendroctonus* en poblaciones de pino (Islas, 1980).

En el territorio nacional se distribuyen 12 especies de *Dendroctonus*, (*D. adjunctus*, *D. approximatus*, *D. brevicomis*, *D. frontalis*, *D. jeffreyi*, *D. mexicanus*, *D. parallelcollis*, *D. ponderosae*, *D. pseudotsugae*, *D. rhizophagus*, *D. valens* y *D. vitei*) varias de las cuales son de gran importancia económica (Zúñiga *et al.*, 1999), y de 13 *Ips* (*I. apache*, *I. bonanseai*,



*I. calligraphus*, *I. confusus*, *I. cribricollis*, *I. emarginatus*, *I. grandicollis*, *I. hoppingi*, *I. integer*, *I. lecontei*, *I. montanus*, *I. pini*, *I. plastographus*) (Ordóñez-Reséndiz *et al.*, 2008).

### 2.3.1. *Dendroctonus frontalis* Zimmermann

*Dendroctonus frontalis* es un escarabajo descortezador ubicado dentro de las principales plagas de los pinos y está distribuida desde Estados Unidos de Norteamérica hasta América Central (Belice, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicaragua) (Billings *et al.*, 2004). En México, *D. frontalis* está distribuido en los estados de Chiapas, Durango, México, Guerrero, Michoacán, Nuevo León, Oaxaca (Cibrián *et al.*, 1995c), pero en los últimos años se ha reportado su presencia en Querétaro y Aguascalientes (Gijón, 2014).

Sus principales hospedantes en México son *Pinus arizonica*, *P. durangensis*, *P. greggii*, *P. maximinoi*, *P. oocarpa*, *P. pringlei*, *P. tecunumanni*, *P. teocote* (Cibrián *et al.*, 1995c).

**Descripción.** El adulto tiene una longitud del cuerpo va de 2.2 a 3.2 mm, son de color café oscuro (Figura 1). En la cabeza la frente es convexa, con dos elevaciones laterales en su porción media, justo por abajo del nivel superior de los ojos que están separados por un surco. En la parte superior de cada elevación y en los márgenes dorsales medios del surco, se encuentran dos gránulos prominentes que algunas veces están en posición media



**Figura 1.** Vista lateral de *Dendroctonus frontalis*, colectado en la Sierra Gorda de Querétaro.

dorsal. El pronoto presenta la superficie lisa, con puntuaciones laterales poco abundantes y poco profundas. Declive elitral con pendiente moderada; setas abundantes de dos clases de tamaños, las más pequeñas de la misma longitud que la anchura de una interestría (Cibrián *et al.*, 1995c).

**Ciclo de Vida.** El ciclo se inicia con la emergencia de los adultos que vuelan de árboles infestados hacia árboles nuevos. Las hembras adultas liberan feromonas que son atractivos poderosos, las cuales, junto con los olores liberados por las perforaciones frescas del hospedante, estimulan a los adultos de *D. frontalis* que se encuentran en el área para agregarse sobre el fuste del árbol. La hembra, después de seleccionar al hospedante inicia la perforación de la corteza seguida del macho posteriormente inician la construcción de una cámara nupcial en el floema en donde se lleva a cabo la cópula. La hembra deposita los huevecillos y después de 1 a 3 semanas, dependiendo de la temperatura, eclosionan los huevecillos y emergen las larvas que construyen galerías delgadas. El cuarto ínstar se dirige hacia la corteza externa en donde hace una cámara de pupación. La duración del período de pupa a adulto es de 15 a 30 días. El preadulto permanece en la cámara hasta que se presentan los procesos cuticulares de esclerosamiento y obscurecimiento. Durante este tiempo el preadulto cambia de color amarillo a café rojizo y finalmente a color negro. Cuando los adultos terminan su desarrollo en la cámara de pupación, inician la barrenación a través de la corteza externa, hasta hacer un orificio de emergencia al exterior (Cibrián *et al.*, 1995c).

**Daños.** El daño directo que ocasiona es la muerte de los árboles; los insectos introducen hongos manchadores de la madera que contribuyen de manera importante en la muerte del árbol, la cual ocurre en pocos días (Cibrián *et al.*, 1995c). El daño que causan se debe principalmente a que las hembras transmiten al hongo *Ophiostoma* en los tejidos del hospedero (Pérez *et al.*, 2009) y una vez ahí las hifas tienen la capacidad de matar a las células del cambium que rodean la galería, impidiendo con ello el flujo de resina y causando la rápida deshidratación del xilema, así como el bloqueo del agua en la traqueidas (López y Toledo, 2005). Los árboles más susceptibles son los dañados por incendios y resinación excesiva, así como los que se encuentran en sobredensidad, en sitios de baja productividad o aquellos de edad sobremadura (Cibrián *et al.*, 1995c).

**Importancia.** Anualmente miles de árboles mueren por ataques de *Dendroctonus* spp. (Miller y Borden, 2000; Gillette *et al.*, 2001; Holsten *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2003; Diaz *et al.*, 2006, Salinas *et al.*, 2010). En los últimos años, los altos índices de infestación en bosques de pino han dado lugar a altos índices de mortalidad.

En los Estados Unidos de Norteamérica se han originado pérdidas de madera causadas por *D. frontalis* hasta por 237 millones de dólares por año (Ungerer *et al.*, 1999). En el año 2003, el servicio forestal del Departamento de Agricultura de Estados Unidos

estimó que del 15% a 30% del piñón había sido destruido en más de 1.6 millones de hectáreas (Fettig *et al.*, 2006).

### 2.3.2. *Ips lecontei* Swaine

Las especies del género *Ips* comúnmente son consideradas como descortezadoras secundarias (Kolb *et al.*, 2008) porque sólo pueden establecerse en arboles debilitados, derribados (Klepzig *et al.*, 1991) o bien después del ataque de diferentes especies del género *Dendroctonus* (Fonseca *et al.*, 2009). Pero existe evidencia de que en las últimas décadas algunas especies del género *Ips* se comportan como especies primarias, debido principalmente a que, con el aumento de sus poblaciones en los árboles dañados, se genera competencia por espacios entre ellas lo que les obliga a colonizar árboles sanos adyacentes (Fonseca *et al.*, 2008).

*Ips lecontei* se distribuye en el sureste de Estados Unidos de Norteamérica, Honduras y en México, principalmente en los estados de Chiapas, Chihuahua, Colima, Durango, México, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Oaxaca y Sonora (Camacho, 2012).

De acuerdo con Cibrián (1995b) sus principales hospederos son *Pinus arizonica*, *P. ayacahuite* var. *brachyptera*, *P. cooperi*, *P. durangensis*, *P. engelmannii*, *P. leiophylla*, *P. montezumae*, *P. oocarpa*, *P. pseudostrobus*.

**Descripción.** El tamaño del adulto varía de 4 a 4.7 mm; es de color café muy oscuro (Figura 2). Presenta 5 espinas en el declive elitral y tiene como característica diagnóstica el no presentar un tubérculo frontal medio en los machos y en su lugar se encuentra un par de tubérculos submedianos sobre el epistoma, lo que da la apariencia de ser un tubérculo bífido (Cibrián *et al.*, 1995b).



**Figura 2.** Vista lateral de *Ips lecontei*, colectado en la Sierra Gorda de Querétaro.

**Ciclo de vida.** Se presentan varias generaciones por año; los estados de desarrollo están sobrepuestos. Al igual que otras especies del género, *I. lecontei* es polígamo. Hace

sus galerías en forma de “Y” y en cada brazo se encuentra una hembra, las cuales ovipositan en ambos lados de su galería. Las larvas hacen galerías individuales, siempre en contacto con el cambium y el floema (Cibrián *et al.*, 1995b).

**Daños.** Esta especie normalmente infesta árboles caídos y vive en el fuste o en las ramas de ellos; sin embargo, cuando hay períodos prolongados de sequía, el insecto es capaz de infestar y causar la muerte de árboles verdes (Cibrián *et al.*, 1995b). Lo que provoca la muerte del hospedero es el ataque en masa, así que para poder atacar árboles vivos estos deben encontrarse muy estresados y con defensas insuficientes para detener el ataque, o bien deben establecerse después del ataque inicial de *Dendroctonus* (Camacho, 2012). Además de causar la muerte de árboles, el insecto también introduce hongos que manchan a la madera y reducen su valor comercial (Cibrián *et al.*, 1995b).

**Importancia.** Las infestaciones en árboles verdes por *I. lecontei* ocurren cada vez que hay sequías prolongadas, pero una vez que pasa el efecto de la sequía las poblaciones de insectos descortezadores bajan y se vuelven incapaces de infestar árboles vivos; sin embargo, para que esto suceda transcurre un intervalo de tiempo variable; mientras tanto, en el monte se acumulan volúmenes que eventualmente pueden justificar la realización de saneamiento. Las infestaciones de *I. lecontei* en árboles jóvenes, se dan en grupos que pueden incluir varias decenas de árboles (Cibrián *et al.*, 1995b).

## 2.4. Métodos de control de los descortezadores

### 2.4.1. Control legal

En México existe la NOM-019-SEMARNAT-2006 que es donde se establecen los lineamientos técnicos para el combate y control de descortezadores, considerados como las plagas más importantes debido los daños que causan al arbolado y al grado de afectación económica que producen. Entre los géneros mencionados en la norma se encuentran *Dendroctonus* e *Ips*; anotando 11 especies presentes del género *Dendroctonus* y 12 del género *Ips* (SEMARNAT, 2008).

La norma establece los lineamientos técnicos de los métodos que se deben cumplir para el manejo (combate y control) de los insectos descortezadores en plantas de las especies de coníferas, *Quercus* y *Fraxinus* (SEMARNAT, 2008).

Los métodos de combate y control se aplican cuando la Comisión Nacional Forestal detecta brotes activos de insectos descortezadores, es decir un grupo de tres o más árboles en una superficie de 1000 m<sup>2</sup> con poblaciones de insectos descortezadores bien establecidas, cuya presencia puede detectarse por observar a los insectos vivos en cualquier estado de desarrollo debajo de la corteza (SEMARNAT, 2008).

Los métodos de combate y control establecidos en la norma consisten en la remoción y destrucción de los insectos plaga, a través de actividades manuales y mecánicas como el derribo del arbolado, seccionado de fustes, descortezado de troncos y ramas; la quema, enterrado o abandono de corteza y ramas; y el control de residuos, y en algunos casos, la aplicación de insecticidas formulados con deltametrina y bifentrina (SEMARNAT, 2008).

Las tácticas de supresión que con mayor frecuencia se utilizan son: Derribo y abandono, este método es aplicable en donde los árboles derribados tienen dificultad para ser aprovechados; en este caso sólo se derriban los árboles con infestación actual, todos los árboles que se corten deben caer en dirección del centro del manchón. Derribo y descortezado, este método involucra el trabajo de descortezar toda el área del fuste que fue infestada por los descortezadores, la corteza que contiene a la población de insectos se puede quedar sin ningún tratamiento, aunque se corre el riesgo de que aquella parte de la población que está como preadulto pueda salir y volar hacia otros árboles. Derribo, descortezado y quema de la corteza, este procedimiento es completamente eficiente para reducir a la población de descortezadores; es muy similar al anterior, sólo que en este caso se apila toda la corteza y se quema con un lanzallamas. Derribo, descortezado y aplicación de insecticidas, la diferencia con el anterior consiste en que a la corteza apilada se le aplica un producto insecticida al que se le adiciona un adherente. Derribo, aplicación de insecticidas y extracción, si las trozas no se descortezan, se debe aplicar un insecticida a la corteza del fuste; el producto a utilizar debe tener persistencia moderada y baja toxicidad a vertebrados. Los métodos anteriores se pueden usar en combinación, de acuerdo al tamaño de la infestación y a la accesibilidad a la misma (Cibrián *et al.*, 1995a).

## 2.4.2. Control con semioquímicos

Existen otros métodos de control como el monitoreo con semioquímicos que son compuestos aromáticos volátiles que sirven a los organismos para comunicarse, es decir, son sustancias que se volatizan en el ambiente en cantidades minúsculas y sirven de señales para transmitir información entre individuos de la misma especie la cual es recibida en las antenas (Price, 1997).

Los escarabajos descortezadores producen semioquímicos denominados “feromonas de agregación” a través de las cuales propician un ataque masivo de individuos que suprime las defensas de los hospederos (Byers, 1989). Por ejemplo, las hembras de *Dendroctonus frontalis* liberan la feromona frontalina ((1S, 5R)-1,5-dimetil-6,8-dioxa-[3, 2, 1]-bicyclooctano) (Kinzer *et al.*, 1969). Para evitar la saturación de competencia intraespecífica, algunas liberan “feromonas antiagregantes” como indicadores de que el árbol atacado ya ha sido totalmente colonizado, con lo que se suspende el arribo de escarabajos al árbol. Tal es el caso de la verbenona (4, 6,6-trimetil-biciclohepta-3-en-2-ona) producida por *D. frontalis*, *D. brevicomis* y *D. ponderosae* (Byers, 1989; Pain y Bertram, 1995). Para el caso del género *Ips* se han utilizado feromonas como el ipsenol, ipsdienol (Miller *et al.*, 2005) y cis-verbenol (Camacho, 2012).

En los últimos años varios investigadores han evaluado concentraciones, tasas de liberación y formulaciones de feromonas antiagregantes y sustancias volátiles de árboles no hospederos que sean aplicables en condiciones de campo; el objetivo es proteger a los hospederos mediante la creación de un escudo aromático que engañe a los insectos en proceso de dispersión enviando la señal de “ocupado” u “hospedero equivocado” para evitar el ataque (Sánchez-Martínez *et al.*, 2012).

## 2.4.3. Control biológico

### 2.4.3.1. Hongos

Los microorganismos entomopatógenos considerados como insecticidas biológicos, se han desarrollado como una herramienta importante para el manejo integrado de insectos plaga en sistemas agrícolas, urbanos y forestales (Faria y Wraight, 2007). El efecto que tienen sobre los insectos es una infección que puede ocasionar una alta mortalidad en las

poblaciones de las plagas susceptibles y por tanto reducir su efecto negativo en los bosques o cultivos. En la actualidad ya existe un avance notable en el conocimiento del efecto y el uso de entomopatógenos, incluso existen productos comerciales formulados con algunas de las principales plagas agrícolas (Faria y Wraight, 2007); sin embargo, para insectos descortezadores esta línea de investigación ha sido poco estudiada.

A nivel laboratorio, Steinwender *et al.* (2010) determinaron que el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* provocó la muerte de 93% de las muestras del descortezador *Ips sexdentatus* en un periodo de ocho días, a la vez que no afectó a *Thanasimus formicarius*, depredador del descortezador.

*Beauveria bassiana* también está asociado de manera natural y consistente con el descortezador *Ips typographus* (Landa *et al.*, 2001). Batta (2007) desarrolló una formulación de *B. bassiana*, consistente en una emulsión invertida, la cual produjo hasta 100% de mortalidad sobre el descortezador del almendro *S. amygdali* en bioensayos de laboratorio, y de 81 a 86.5% de mortalidad en experimentos de campo. Según Batta (2007), mediante la formulación de emulsión invertida, *B. bassiana* fue capaz de penetrar al interior de las galerías de los insectos al ingresar por los orificios que *Scolytus amygdali* hace durante el ataque.

Gijón (2015) reportó la efectividad biológica de *Trichoderma* spp *in vitro* sobre insectos descortezadores, mostrando un 100% de mortalidad con la cepa T01.

#### **2.4.3.2. Insectos y ácaros**

Los enemigos naturales de los descortezadores juegan un papel importante en su dinámica poblacional, al ser capaces de disminuir los niveles de población hasta valores más bajos de los que alcanzarían sin su presencia, ello constituye un control biológico natural (Viñuela *et al.*, 1993; Viñuela *et al.*, 2002).

De los enemigos naturales asociados a *D. frontalis* y *D. mexicanus*, Reséndiz *et al.* (2016) mencionan que los depredadores más representativos en el municipio de Landa de Matamoros, Qro. fueron el escarabajo depredador *Elacatis* sp., seguido de *Temnochila* sp. y *Leptacinus* sp. Para el género *Ips* se señalan como enemigos naturales a especies de *Enoclerus*, *Thanasimus* (Miller *et al.*, 1991), *Temnochila*, *Elacatis*, *Platysoma* y *Tenebroides* (Cane *et al.*, 1990), que resultan atraídos por las feromonas secretadas por el hospedero.

Los depredadores resultan una de las herramientas más prometedoras en el control de poblaciones de descortezadores.

Los ácaros tienen el potencial de alterar las interacciones entre los descortezadores y los diferentes microorganismos, por lo tanto, pueden influir en la estructura, la diversidad y la robustez de las comunidades de estos insectos (Hofstetter y Moser, 2014). Los ácaros digamáselidos se encuentran con frecuencia asociados a diferentes descortezadores (Lindquist, 1967), algunas especies se alimentan de estadios inmaduros de estos escarabajos (Chaires *et al.*, 2015). A nivel mundial se han registrado 37 especies de ácaros de la familia Digamasellidae asociados a estos insectos descortezadores, estas especies están incluidas en cuatro géneros (*Dendrolaelaps*, *Insectolaelaps*, *Longoseius* y *Multidendrolaelaps*). Los digamáselidos se han encontrado en nueve especies del género *Dendroctonus* (*D. adjunctus*, *D. aproximatus*, *D. brevicomis*, *D. frontalis*, *D. pseudotsugae*, *D. rhizophagus*, *D. simplex*, *D. terebrans* y *D. valens*), ocho especies de *Ips* (*I. bonansea*, *I. calligraphus*, *I. confusus*, *I. cribicollis*, *I. grandicollis*, *I. pini*, *I. sexdentatus*, *I. typographus*) (Hofstetter *et al.*, 2015).

#### **2.4.3.3. Nematodos**

La utilización de nematodos en el control de descortezadores es prácticamente inexistente. Stevens y Flakes (1974) y Safranyik y Hall (1990) señalan a *Parasitylenchus stipatus* Massey y *Parasitaphelenchus dendroctoni* Massey como nemátodos parásitos internos comunes en *Dendroctonus adjunctus*, que frecuentemente reducen la producción de huevecillos de este descortezador en un 50% en hembras infestadas.

### **2.5. Nematodos entomopatógenos**

Una de las asociaciones de parasitismo obligado que se han utilizado en los últimos años para el control biológico es con nematodos entomopatógenos. El término de nemátodo entomopatógeno se refiere a la habilidad que tienen de matar rápidamente al hospedero (Georgis y Poinar, 1994). Estos organismos mantienen una relación simbiótica con una bacteria, las cuales inducen la muerte por septicemia del huésped dentro de las 24 a 48 h posteriores a la infección (Merino y France, 2009).



Este tipo de nematodos tiene características excelentes que les permite ser agentes de control biológico, como por ejemplo buscar activamente a sus hospederos y matarlos rápidamente al entrar en él y liberar a la bacteria simbiote (Liu y Poinar, 2000), además son letales a un amplio rango de insectos de importancia económica (Bathon, 1996), siendo utilizados exitosamente en el control de diversas plagas agrícolas, tales como: gusanos cortadores, polillas, broca del café, picudos, gusano blanco, chinches, escamas, candelilla, entre otros (Rosales *et al.*, 2009). Sin embargo, aunque tienen un amplio rango de hospederos se cree que los riesgos de las aplicaciones de nematodos son bajos para otras especies que no son plagas (Jansson, 1993), en parte porque los nemátodos tienen movilidad limitada y están restringidos a ambientes específicos, debido a su intolerancia a la resequedad y a otras condiciones físicas desfavorables (Georgis *et al.*, 1991) por ejemplo, se demostró que *Steinernema carpocapsae* no tiene efecto en lombrices terrestres (*Aporrectodea* sp.) (Capinera *et al.*, 1982). Estos nematodos se pueden producir masivamente y ser aplicados fácilmente (Merino y France, 2009).

Además, los nematodos entomopatógenos son seguros para mamíferos, invertebrados y plantas (Boemare *et al.*, 1996), para comprobar que no dañan a otros vertebrados, Gaugler y Boush (1979) infectaron ratas en forma oral y por inyección con *Steinernema carpocapsae* las cuales no mostraron signos de patogenicidad, toxicidad o infección.

### **2.5.1. Morfología**

Los nematodos tienen simetría bilateral, al igual que todos los animales del grupo bilateria son triblásticos, es decir, que poseen una tercera capa embrionaria intermedia llamada mesodermo que se encuentra entre el ectodermo y el endodermo (Baguña, 2008). Son pseudocelomados, lo cual quiere decir que el blastocele original del embrión persiste como un espacio o cavidad del cuerpo, entre el tubo digestivo y la pared del cuerpo. Esta cavidad se denomina pseudocele, ya que carece del revestimiento peritoneal que se encuentra en los verdaderos celomados (Hickman, 2000). Su longitud es muy variable (Seijas, 2004).

Los caracteres distintivos de este grupo son su forma cilíndrica, generalmente filiformes, no segmentados, rodeados de una cutícula flexible de gran importancia funcional

para el animal, al servir para resistir la alta presión hidrostática ejercida por el fluido de pseudocele. Las distintas capas de la cutícula son principalmente de colágeno, una proteína estructural. Sus músculos se sitúan debajo de la hipodermis y solo se contraen longitudinalmente, el fluido que llena el pseudocele, que baña los órganos internos constituye un esqueleto hidrostático que presta soporte para la transmisión de la fuerza de contracción muscular (Hickman, 2000).

Su aparato digestivo está adaptado a sus hábitos alimenticios, pero el tubo digestivo está compuesto de boca, faringe muscular, intestino largo no muscular, un recto corto y un ano terminal. El alimento es succionado al interior de la faringe cuando los músculos de la porción anterior se contraen y abren su luz, la relajación de los músculos la cierra, empujando la comida hacia atrás del intestino. La defecación se efectúa mediante músculos que abren el ano, y la fuerza de expulsión procede de la presión del pseudocele que rodea las vísceras. Su sistema excretor consta de células glandulares que abren en el poro excretor, o un sistema de canales sin células, o con células y canales juntos (Hickman, 2000).

No tienen aparato circulatorio ni respiratorio pero la cavidad del cuerpo contiene plasma de células ameboides (Alvarado, 2012). Tienen un sistema nervioso bastante desarrollado. Alrededor de la faringe existe un anillo de tejido nervioso y ganglios que envían pequeños nervios hacia el extremo anterior y a los dos cordones nerviosos, uno dorsal y otro ventral. Las papilas sensoriales se concentran alrededor de la cabeza y de la cola. Los anfidios son órganos sensoriales complejos que abren a cada lado de la cabeza (Hickman, 2000).

En los nematodos hay hembras, machos y hermafroditas. El macho es generalmente más pequeño que la hembra, y en su extremo posterior lleva un par de espinas copuladoras llamadas espículas. La fecundación es interna y los huevos se almacenan regularmente en el útero hasta su puesta. Después del desarrollo embrionario, el huevo eclosiona dando un individuo juvenil. Los cuatro estados embrionarios están separados por una muda de la cutícula. Muchos nematodos parásitos tienen estados juveniles de vida libre, otros requieren un hospedante intermediario para completar su ciclo vital (Hickman, 2000).

### 2.5.2. Ciclo de vida

El ciclo de vida puede variar dependiendo el género del nematodo, comprenden un estado de huevo, cuatro estadios juveniles y un estado adulto (machos, hembras o hermafroditas) (Poinar, 1993). Generalmente pueden producirse dos generaciones completas del nemátodo (Smart y Nguyen, 1994) en el insecto huésped dependiendo de su tamaño.

El tercer estadio juvenil es el infectivo, llamado en ocasiones “larvas dauer”, el cual presenta una doble cutícula (encerrado en la cutícula del segundo estadio), es la única fase del ciclo biológico del nematodo que se encuentra fuera del insecto; este estadio infectivo transporta la bacteria simbiote en su intestino, y es el encargado de sobrevivir en el medio hasta que localiza un nuevo hospedero. En este estado el nematodo no se alimenta, posee la boca y el ano cerrado y sobrevive de las reservas acumuladas antes de su salida del cadáver del insecto donde se encontraba (Merino y France, 2009).

La localización de su huésped se produce de forma activa, salta sobre ellos o los persigue en respuesta a diversos estímulos físicos y químicos generados por el insecto, entre los que destacan los gradientes de temperatura y productos de excreción, los niveles de dióxido de carbono proveniente de su respiración, así como también los simbiotes bacterianos, pH y componentes químicos del medio, para inmediatamente penetrar a través de las aberturas naturales, boca y ano, espiráculos o ano través de las partes suaves del integumento, debido a que los juveniles infectivos poseen un diente dorsal con el cual pueden raspar la cutícula y entrar directamente al hemocele de ciertos insectos (Merino y France, 2009).

Una vez dentro del insecto, el juvenil infectivo entra en el hemocele del hospedero y libera la bacteria a través del ano o la boca hacia la hemolinfa del insecto (Boemare *et al.*, 1993). Las células bacterianas se multiplican rápidamente ocasionando la muerte del insecto huésped por septicemia, generalmente dentro de 24 a 48 h (Grewal, 2000). A partir de este momento y a través de la acción de las enzimas proteolíticas liberadas por la bacteria, se produce la destrucción total de las estructuras internas del insecto, lo que proporciona los nutrientes necesarios para el desarrollo del nematodo (Akhurst, 1982) Los juveniles infectivos se alimentan de la bacteria y tejidos del hospedero, mudan a la cuarta etapa y en consecuencia en machos y hembras de

la primera generación (Smart, 1995). Después de aparearse, la hembra pone huevos emergiendo la primera etapa juvenil que muda sucesivamente convirtiéndose en machos y hembras de la segunda generación (Smart y Nguyen, 1994).

Los adultos de la segunda generación copulan y producen huevos a partir de los cuales nace el primer estado juvenil, posteriormente mudan al segundo instar, cuando los nutrientes del hospedero se agotan. El segundo instar deja de comer almacenando alrededor de 200 células de su bacteria simbiótica dentro de una porción ventricular del intestino, en todo el intestino o en el lumen faringeal (Boff *et al.*, 2000). Cuando el nematodo muda al tercer instar retiene la cutícula del segundo instar y abandona el cadáver en búsqueda de nuevos hospederos (Campbell y Gaugler, 1991).

### 2.5.3. Taxonomía

Los nematodos se encuentran ubicados en el Phylum Nemata, el cual se subdivide en las clases Secernetea y Adenophorea (Ferris, 2008). Los nematodos entomopatógenos conocidos o bien los que tienen posibilidades de control biológico se encuentran en cuatro órdenes: Rhabditida, Mermitida, Tylenchida y Aphelenchida (Smart y Nguyen, 1994).

Dentro del orden Rhabditida se encuentran a las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae parásitos facultativos de insectos (Smart y Nguyen, 1994); Diplogasteridae, una familia de nematodos con interacciones “necromenic”, las cuales se consideran una pre-adaptación al parasitismo (Dillman *et al.*, 2012), en donde el nematodo entra al insecto huésped, pero no lo perjudica sino hasta que el huésped muere, el nematodo avanza hasta la edad adulta mientras se alimenta de hongos y bacterias que proliferan en el cadáver del huésped (Rae *et al.*, 2008), tienen abundantes genes que codifican para la degradación y desintoxicación, que ayudan a la supervivencia dentro de los cadáveres de insectos (Dieterich *et al.*, 2008).

La familia Steinernematidae comprende dos géneros: *Steinernema* Travassos, 1927 (Hominick *et al.*, 1997) y *Neosteinernema* Nguyen y Smart, 1994 (Smart y Nguyen, 1994). La familia *Heterorhabditidae* comprende el género *Heterorhabditis*. La familia Diplogasteridae comprende 28 géneros (Poinar, 1975) y la familia Diplogastridae se considera un posible taxón parafilético, porque muchos de los caracteres entre géneros se superponen, por lo tanto, para organizarla taxonómicamente, se necesitan más

especímenes con descripciones morfológicas detalladas y marcadores moleculares específicos de cada género y especie (Sudhaus y Fürst von Lieven, 2003).

#### **2.5.4. Bacterias simbiotas**

La relación que existe entre el nematodo y la bacteria constituye un ejemplo de mutualismo. La bacteria es incapaz de sobrevivir en el suelo por lo tanto requiere del juvenil infectivo para su protección, reside en el intestino, al carecer de habilidad de invasión es dependiente del nematodo, para transportarse dentro del hemocele del hospedero (Morgan *et al.*, 1997; Reyes, 2003); asimismo recibe la protección del nematodo ya que éste inhibe las defensas antibacterianas del hospedero (Kaya y Koppenhofer, 1999).

El nematodo recibe los beneficios de la bacteria, debido a que ésta mata al hospedero rápidamente y crea un ambiente favorable para el crecimiento y reproducción del nematodo al inhibir el crecimiento de microorganismos competidores a través de la producción de antibióticos (Paul *et al.*, 1981; Richardson *et al.*, 1988; Li *et al.*, 1995; Hu *et al.*, 1998; Reyes, 2003). La bacteria transforma los tejidos del hospedero en una fuente de comida para el nematodo y asimismo la bacteria sirve como fuente de alimento para el nematodo (Kaya y Koppenhofer, 1999). Sin la presencia de la bacteria simbiótica en el cadáver del insecto, los nematodos son incapaces de reproducirse (Poinar y Thomas, 1966; Reyes, 2003).

#### **2.5.5. Ecología**

La gran diversidad morfológica, de comportamiento y adaptaciones fisiológicas que tienen los nematodos les han permitido ser abundantes en prácticamente todos los hábitats (Roberts, 2000). Estando distribuidos prácticamente en todos los continentes (Hominick *et al.*, 1996) han sido aislados en diferentes tipos de suelos desde el nivel de mar a altas altitudes, en hábitats naturales y agrosistemas perturbados (Kaya y Koppenhofer, 1999; Reyes, 2003).

La actividad de los nematodos depende de una película de agua, aunque pueden encontrarse en zonas áridas y polares en las cuales sobreviven a la desecación o a la congelación en un estado criptobiótico. La mayoría viven dentro de los espacios intersticiales entre las partículas del suelo u otro sustrato y es por eso que su ecología está

determinada por propiedades físicas tales como la porosidad, viscosidad, tensión superficial, difusión gaseosa y humedad (Warwick, 1984).

Existen otros factores que influyen en su ecología, tales como el tamaño de las partículas de suelo, la cantidad de materia orgánica presente en el suelo, los niveles de pH del suelo, la radiación solar, la temperatura, humedad y oxígeno (Freckman y Baldwin, 1990).

## 2.6. Nematodos entomopatógenos en México

Para México no hay información con respecto al potencial, identificación y distribución de nematodos nativos como alternativa de control de plagas forestales; sin embargo, existen trabajos principalmente en zonas de manejo agrícola. Los estados donde se ha reportado la presencia de nematodos entomopatógenos son Colima, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Sonora, Tamaulipas, Veracruz y Zacatecas (Delgado- Gamboa, 2014).

En Oaxaca Girón-Pablo *et al.* (2012) encontraron a *Heterorhabditis mexicana*, *Steinernema carpocapsae* y *Steinernema feltiae* en cultivos de maíz. En seis estados del Pacífico Centro Mexicano (Colima, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Sinaloa y Veracruz), González (2006), recolectó 147 muestras de suelo de 89 localidades, con una tasa de recuperación del 23.8%, es decir, un total de 35 muestras positivas, 71.4% *Steinernema* spp. y 28.6%.de *Heterorhabditis* spp.

En Sonora, Stock *et al.* (2009) aislaron una cepa de *Heterorhabditis* sp. en cadáveres de ninfas de la cigarra *Dicerorpocta ornea* (Hemiptera: Cicadidae) en campos cultivados con esparrago en Caborca, la cual posteriormente fue caracterizada tanto morfológica y molecularmente como *Heterorhabditis sonorensis*.

En Veracruz, en áreas de cultivo de caña de azúcar, Grifaldo- Alcántara (2011), recolectó un total de 18 muestras de suelo y obtuvo tres aislados de nematodos entomopatógenos, los cuales después de realizar la caracterización morfológica y molecular, señala que pertenecen a la misma especie y presentan similitud con *Steinernema riobravis*.

En Sinaloa, Vázquez (2012) aisló ocho poblaciones de posibles nematodos entomopatógenos utilizando la técnica de insecto trampa en suelos cultivados con maíz en el Valle de Guasave. Se identificaron molecularmente como *Rhabditis rainai* y *Rhabditis blumi*.

## 2.7. Cultivo de nematodos entomopatógenos

Los nematodos entomopatógenos se cultivan *in vivo* (en un insecto hospedero) o *in vitro* para pruebas de laboratorio o para la producción comercial (Friedman, 1990). La polilla de la cera *Galleria mellonella* (Lepidóptera: Pyralidae), es el insecto de elección para la producción *in vivo debido a que* es muy susceptible a la infección por el nematodo y es muy fácil distinguir los síntomas de infección, así como su cría en el laboratorio (González, 2006).

*Galleria mellonella* habita en las colmenas. Es responsable de grandes pérdidas en los apiarios en el mundo, causando grandes daños en climas tropicales. Bajo condiciones naturales las larvas se alimentan en los panales, donde se desarrollan hasta el estado adulto. Bajo condiciones de laboratorio las larvas son fácilmente criadas en cera y polen. La producción masiva de *G. mellonella* no necesita requerimientos especiales, pero se usa generalmente con fines limitados a la investigación y a microensayos. Una larva de *G. mellonella* puede producir hasta 200 000 juveniles infectivos de nematodos. Varios hospederos alternativos se conocen para este fin, entre ellos *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) y *Amyelios transitella* Walker (Lepidoptera: Pyralidae) que han sido usados para la cría de nematodos de una manera económica. Para mantener una producción de nematodos entomopatógenos en el laboratorio, es necesaria la cría de su hospedero de los mismos para obtener mejores resultados (González, 2006).

La producción *in vivo* a escala industrial puede ser aplicable en países desarrollados, porque requiere mucha mano de obra y es costoso, pero resulta en nematodos de alta calidad (Shapiro-Ilan *et al.*, 2003).

La producción *in vitro* es un método que se realiza en medios de cultivo sólidos y líquidos a pequeña o gran escala. El método y las condiciones dependen particularmente de cada especie. Se producen grandes cantidades de nematodos por Erlenmeyer en medio solido tridimensional (esponja impregnada en un medio nutritivo), los cuales pueden ser usados en pruebas de campo o en pequeñas parcelas experimentales (González, 2006).

Los métodos de medios sólidos son bajos en costos y se requiere experiencia limitada (pero más que en el método *in vivo*), y la logística de producción es flexible (Ehlers, 2001). Para el cultivo líquido exitoso, los factores claves son medios favorables y oxígeno adecuado (Han, 2002). Los componentes típicos de un medio son extractos de levadura como una fuente de nitrógeno; una fuente de carbohidratos tal como harina de soya, glucosa o glicerina, lípidos de plantas u origen animal y las sales (González, 2006).

Para la producción *in vitro* a gran escala se han utilizado fermentadores que pueden alcanzar volúmenes de 80 000 litros, capaces de producir millares de nematodos por semana con el fin de ser comercializados para ser aplicados. Este método es utilizado en empresas de Europa, Asia y Norte América. Sin embargo, esta técnica requiere equipos muy especializados y costosos (González, 2006).



### 3. OBJETIVOS

#### Objetivo general

Identificar nematodos nativos con potencial para el control biológico del complejo de insectos descortezadores en la Sierra Gorda de Querétaro y en la Sierra Fría de Aguascalientes.

#### Objetivos particulares

- Aislar nematodos en suelos de boques de pino del municipio de Pinal de Amoles, de la Sierra Gorda de Querétaro y municipio de San Juan de Gracia de la Sierra Fría de Aguascalientes.
- Identificar morfológica y morfométricamente a los nematodos aislados.
- Caracterizar molecularmente los nematodos aislados.
- Comprobar la patogenicidad de los nematodos sobre insectos descortezadores
- Evaluar la reproducción *in vitro* de los nematodos con potencial biocontrolador

## 4. ÁREA DE ESTUDIO

### 4.1. Estado de Querétaro

La reserva de la biósfera Sierra Gorda, se ubica al norte del estado de Querétaro, entre los paralelos 20° 50' y 21° 45' de latitud norte y los meridianos 98° 50' y 100° 10' de longitud oeste, con una extensión de 383 567 ha, lo que representa el 32.02% del territorio total del estado (INE, 1999).

En la parte central, que comprende los municipios: Arroyo Seco, Jalpan de Serra, Pinal de Amoles y Landa de Matamoros predomina el clima semicálido-subhúmedo. Las temperaturas mínimas se dan en los meses de diciembre y enero, las máximas en abril y mayo y el promedio anual varía de 13 °C en las zonas altas de Pinal de Amoles a 24 °C en las regiones más bajas como Jalpan; la precipitación media anual es de 883.33 mm como máxima y 313.31 mm como mínima. La vegetación se caracteriza por bosques y selvas en sus diferentes modalidades, como son bosque tropical subcaducifolio, bosque tropical caducifolio, bosque mesófilo de montaña, bosque de encino y bosque de coníferas (INE, 1999).

Para el presente trabajo los recorridos se realizaron en los municipios de Pinal de Amoles y Landa de Matamoros. Los predios en donde se llevaron a cabo las colectas de suelo fueron georeferenciados (cuadro 1). La vegetación se determinó como bosque de pino encino de acuerdo con la carta de uso de suelo y vegetación modificada por CONABIO (1998).

**Cuadro 1.** Ubicación geográfica y nombre del predio donde se recolectaron las muestras para el aislamiento de nematodos entomopatógenos en Querétaro

SITIO	MUNICIPIO	PREDIO	PARAJE	LATITUD N	LONGITUD O
1	Pinal de Amoles	La Gachupina	La Gachupina	21°09'13"	99°37'37"
2	Pinal de Amoles	Puerto del Judío	Campo Santo	21°07'50"	99°37'46"
3	Pinal de Amoles	El Tejamanil	El Tejamanil	21°07'36"	99°38'29"
4	Landa de Matamoros	Ejido el Madroño	Entrada al Madroño	21°16'11"	99°09'35"

## 4.2. Estado de Aguascalientes

El Área Natural Protegida Sierra Fría (ANPSF), con protección del gobierno estatal conforme al decreto del 30 de enero de 1994, tiene una superficie de 112,090 ha (Gobierno del Estado de Aguascalientes, 1994). Se ubica al noroeste del estado de Aguascalientes y comprende parte de los municipios de San José de Gracia, Pabellón de Arteaga, Rincón de Romos, Calvillo y Jesús María. Es una región montañosa con un rango altitudinal que va de 2200 a 3050 m, recibe en promedio una precipitación anual que oscila entre los 600 y los 700 mm.

Esta área natural protegida es de gran importancia a nivel estatal, ya que contiene 90% de los bosques templados y de montaña (SEDESO, 1993) y una porción importante del capital natural de la entidad. El valor de esta área natural radica no sólo en su riqueza biológica, sino también en los servicios ecosistémicos que ofrece a la sociedad (CONABIO, 2008). Entre estos servicios se encuentran la regulación del clima y del ciclo hidrológico, la conservación del suelo, el secuestro de carbono, la purificación y el escurrimiento del agua y, de especial importancia, la recarga de los mantos acuíferos del valle de Aguascalientes, entre otros.

Los recorridos se realizaron en el municipio de San Juan de Gracia, los sitios fueron georreferidos (cuadro 2). La vegetación se determinó como bosque de pino encino de acuerdo con la carta de uso de suelo y vegetación modificada por CONABIO (1998).

**Cuadro 2.** Ubicación geográfica y nombre del predio donde se recolectaron las muestras para el aislamiento de nematodos entomopatógenos en Aguascalientes

SITIO	MUNICIPIO	PREDIO	LATITUD N	LONGITUD O
1	San Juan de Gracia	"El Huapango"	22° 19'47"	102° 63'58"
2	San Juan de Gracia	"Las Manzanillas"	22° 19'43"	102° 63'35"

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Selección de sitios de muestreo

Se realizaron recorridos en la sierra Gorda de Querétaro, en el municipio de Pinal de Amoles y Landa de Matamoros y en la sierra Fría de Aguascalientes, municipio de San José de Gracia con el propósito de seleccionar brotes activos para los sitios de muestreo.

A través de la consulta de registros en las dependencias del sector (CONAFOR), se obtuvo la información de los sitios afectados en 2012 y 2013. Con el cual, se preseleccionaron los sitios para el muestreo y con la guía del personal técnico de la CONAFOR se recorrieron los parajes. Los criterios para considerar a un paraje como candidato a ser seleccionado para el estudio fueron los siguientes:

- Que en el paraje mostrara daños de insectos descortezadores en el año anterior y el actual.
- Que existiera el apoyo de las personas de la comunidad para minimizar los riesgos ante las condiciones de inseguridad.

Una vez seleccionados los sitios, se eligieron los árboles afectados por descortezadores. Los síntomas asociados al ataque que se consideraron fueron los señalados por Bilings (1996) principalmente color del follaje (rojizo, amarillento, verde alimonado y café rojizo) y presencia de grumos de resina en el fuste (suaves-endurecidos y blancos-rosados) sin importar las dimensiones del arbolado (Figura 3a), una vez ubicados los árboles se removieron pequeños trozos de corteza para corroborar la presencia de escarabajos (Figura 3b).



**Figura 3.** Fuste de *Pinus patula*. (a) Grumos de resina, síntoma de ataque por descortezador. (b) Cambium vascular con presencia de galerías de insectos descortezadores.

## 5.2. Muestreo de suelo

La toma de muestras se realizó completamente al azar, tomando muestras de suelo de la periferia de los árboles con presencia de insectos descortezadores. En cada sitio se colectaron 24 muestras de 1 kg a una profundidad de 20-30 cm. Cada muestra se tomó con una pala recta que fue desinfectada con hipoclorito de sodio al 3%.

Las muestras se mezclaron de manera homogénea para obtener una muestra compuesta de 1 kg por sitio (Stock *et al.*, 1999), posteriormente se depositaron en bolsas de poli papel para evitar la pérdida de humedad. Se transportaron al laboratorio de Sanidad Forestal del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Conservación y Mejoramiento de Ecosistemas Forestales (CENID-COMEF). Las muestras se almacenaron en una cámara bioclimática en oscuridad a una temperatura de 25 °C hasta su procesamiento.

## 5.3. Cría de *Galleria mellonella*

Con el objetivo de contar con larvas de *Galleria mellonella* para el aislamiento de NEP, se estableció la cría en condiciones de laboratorio. Se utilizó una dieta artificial compuesta por 250 g de germen de trigo, 250 g de salvado de trigo, 50 ml de glicerina y 100 ml de miel de abeja, se mezcló perfectamente y se esterilizó.

Se colocaron cuatro recipientes de plástico de 30 x 20 cm con una capa de 5 cm aproximadamente de dieta y se pusieron alrededor de 60 larvas por contenedor, se ubicaron en una jaula de nylon con marcos de madera (Realpe, 2007) dentro de un cuarto de cría a una temperatura de entre 25 y 27 °C, y un porcentaje de humedad de entre 31-37%.

Los contenedores se mantuvieron parcialmente cerrados para evitar que el alimento se secase, cada semana eran destapados para permitir la salida de los adultos emergidos. Dentro de la jaula también se colocaron esponjas humedecidas con solución azucarada como alimento para los adultos y trozos de esponja seca para que las hembras ovipositaran; cada 25 días éstas fueron retiradas y puestas en nuevos recipientes con dieta para la emergencia de las nuevas generaciones.

#### **5.4. Aislamiento de nematodos entomopatógenos de suelo**

Los nematodos fueron aislados de muestras de suelo previamente homogenizado, utilizando larvas de *Galleria mellonera* (Lepidoptera: Pyralidae) como cebos (Bedding y Akhurst, 1975). Las muestras de suelo fueron humedecidas con agua potable estéril (Campos-Herrera, 2006).

De cada muestra de suelo se prepararon 10 réplicas en placas Petri, colocando al ras de la placa el suelo (Stuart y Gaugler, 1994). En la superficie se depositaron cuatro larvas de último estadio de *G. mellonella* y se incubaron en una cámara bioclimática a 24 ±3 °C, 50% de humedad relativa y en completa oscuridad (Campos-Herrera, 2006).

Las placas se invirtieron durante los primeros tres días cada 24 h para inducir el movimiento de las larvas y aumentar la posibilidad de hacer contacto con los nematodos (Campos-Herrera, 2006).

Las placas fueron revisadas cada 24 h durante 15 días, las larvas muertas con características por infección de nematodos (coloración: crema, gris, ocre, café o rojizo) fueron lavadas con hipoclorito de sodio 0.5% durante 10 segundos, enjuagadas tres veces en agua destilada estéril y depositadas individualmente en “trampa White” (Figura 4) (White, 1927).

Las larvas fueron inspeccionadas cada 24 horas durante 10 días. Los nematodos que emergieron fueron cosechados y expuestos nuevamente en una caja petri para

reinfectar otro grupo de cuatro larvas de *G. mellonella* para confirmar su patogenicidad y de este modo, comprobar los postulados de Koch (Salas, 2002).



**Figura 4.** Trampa White con larvas de *Galleria mellonella*

### **5.5. Aislamiento de nematodos entomopatógenos por inspección directa**

Adicionalmente se tomaron trozos de corteza infestada con escarabajos descortezadores, se colocaron en bolsas de polipapel y se transportaron al laboratorio de Sanidad Forestal del CENID-COMEF. El material fue inspeccionado para extraer a los insectos descortezadores, determinando su identidad mediante bibliografía especializada (Moser *et al.*, 2005). Posteriormente se realizó una revisión visual y en microscopio estereoscópico para determinar si los especímenes o la corteza venían colonizados por nematodos.

### **5.6. Identificación taxonómica**

Los nematodos aislados fueron colocados en montajes temporales y permanentes para su descripción morfológica y morfométrica. Para los detalles de la morfología de la

región caudal de los machos, como la presencia y disposición de las papilas genitales se hizo la observación de los ejemplares en un microscopio electrónico de barrido.

### **5.6.1. Montajes temporales**

Se tomaron alícuotas de nematodos previamente almacenados y fueron colocados a baño maría de 70-75 °C por 5-7 s y colocados en placas de agar 1% (Rosas, 2014). Se montaron 15 machos y 15 hembras o hermafroditas de cada aislamiento de nematodos, utilizando la primera generación de acuerdo con Campos-Herrera (2006).

Para este estudio se realizaron las medidas indicadas por Ye *et al.* (2015): (n) número de ejemplares, (L) longitud total del cuerpo, (A) anchura total del cuerpo, (PE) distancia del extremo anterior al poro excretor, (ES) longitud del esófago, índices: a (L/A), b (L/ES), c (PE/ES), longitud del estoma (LE), ancho del estoma (AE), distancia del extremo anterior al anillo nervioso (NR), longitud de la cola (T), ancho de la cola a nivel del ano/cloaca (AC), ancho del cuerpo a nivel de la vulva (MBD), longitud de la espícula (SL), longitud del gubernáculo (GW). Las medidas variaron de acuerdo con la especie a determinar.

La observación se efectuó a través de un microscopio compuesto conectado a una cámara digital con el programa Motic Images Plus 2.0 mL, utilizando un rango de magnificación de 10, 40 y 100X.

Una vez tomadas las medidas de cada uno de los aislados de nematodos se realizó la media y el rango para cada una de las características consideradas, y se compararon con los valores generales morfométricos del género de Schulte y Poinar (1991), Herrmann *et. al.* (2006a) y Kreft (2012).

### **5.6.2. Montajes permanentes**

Los nematodos obtenidos de larvas infectadas de *G. mellonella* se deshidrataron por el método de Seinhorst (1959) modificado. Los organismos se transfirieron a un frasco con TAF (Trietanolamina + formaldehido 40% + agua destilada) y se sometieron a baño maría de 73 °C por 5-7 s, se dejaron por aproximadamente una semana. Con la ayuda de



una micropipeta se redujo el volumen de los frascos a la mitad y se agregó un volumen igual de solución A (etanol 96%: 20 ml/ glicerina: 1 ml/ agua destilada: 79 ml). Al día siguiente se redujo el volumen y se transfirió a una placa Petri pequeña. Las cajas se colocaron abiertas en un desecador con etanol 96%, se tapó el desecador y se colocó dentro de una estufa a 33°C durante 12 h.

Pasado este tiempo se redujo el volumen a la mitad y se agregó solución B (etanol 96%: 93 ml/ glicerina; 7 ml) se tapó y colocó dentro de la estufa a la misma temperatura, transcurridas tres horas se agregó de nuevo solución B. Al día siguiente se sacó la caja y se dejó evaporar el alcohol a temperatura ambiente. Una vez evaporado, se agregó solución C (etanol 96%: 80ml/ glicerina: 20 ml) aproximadamente medio volumen de la caja. Se colocó la caja en un lugar donde permitió que el alcohol se evaporara de manera gradual.

La caja del proceso anterior se colocó dentro de un desecador con carbonato de calcio durante una semana. Los nematodos fueron montados en glicerina pura deshidratada y las preparaciones se sellaron con anillo de cera. Los montajes fueron observados en un microscopio óptico y se tomaron fotografías con una cámara digital con el programa Motic Images Plus 2.0 mL, utilizando un rango de magnificación de 10, 40 y 100X.

Mediante esta técnica se describió la morfología general de los nematodos y se determinó hasta nivel de género con el apoyo de Dr. Cristian Nava Díaz, investigador del Colegio de Postgraduados.

### **5.6.3. Microscopia electrónica de barrido**

Para los detalles de la morfología de los ejemplares se realizó microscopia de barrido utilizando la técnica descrita por Robles (2013) modificada.

Se tomaron nematodos almacenados con menos de un mes de cosecha, se lavaron en un tamiz de 400 mallas con agua potable estéril y se transfirieron a viales de vidrio para fijación con glutaraldehído 3% en amortiguador de fosfatos de Sorensen pH 7.2 durante 48 h. Transcurrido el tiempo, se transfirieron a pequeños tamices de 500 mallas y se lavaron dos veces con amortiguador de fosfatos de Sorensen pH 7.2 de tal manera que se eliminó cualquier residuo de fijador.

Luego se deshidrataron con etanol 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% durante 20 minutos cada uno y en 2 deshidrataciones de etanol 100% de 15 minutos cada uno. Una vez esto, se secaron a punto crítico con CO<sub>2</sub>, suministrando CO<sub>2</sub> líquido lentamente. Finalmente se recubrieron con oro por 15 minutos. Las fotografías se tomaron en un microscopio electrónico de barrido marca JEOL JSM-6390.

## **5.7. Identificación molecular**

### **5.7.1. Extracción de ADN**

De cada aislado de nematodos se tomó un ejemplar hembra o hermafrodita adulto, se lavó en agua destilada estéril y se realizó la extracción de ADN a partir de especímenes individuales con el método descrito por SENASICA (2013) modificado, en el cual se transfirió cada espécimen en 10 µl de buffer de extracción (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 0.45 % Tween 20; 0.05% gelatina) sobre un cubreobjetos limpio, se maceró el nematodo con una aguja de insulina bajo el microscopio estereoscópico. Se mezcló la solución buffer de extracción-nematodo con una micropipeta y se transfirió la solución a un tubo de microcentrífuga estéril y se congeló a -20°C por una hora. Pasado el tiempo de congelación, se incubaron inmediatamente los tubos con las muestras a 60°C por una hora, se dio un vortex una vez durante el periodo de incubación. Se agregó 0.5 µl de Proteinasa K cuando faltaban 10-15 min para terminar la incubación. Después se incubaron a 95°C por 15 min (esto permitió la inactivación de la Proteinasa K) y se enfriaron a 4°C.

La calidad y cantidad del DNA genómico se determinó por espectrofotometría (Orozco, 2008) en un nanodrop 2000 termo científico.

### **5.7.2. Amplificación de ADN**

En el presente estudio se utilizaron las regiones Large Subunit o LSU (subunidad grande) y Small Subunit o SSU (pequeña subunidad) para determinar los aislamientos a nivel de especie. Se utilizó la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para amplificar la región LSU o 28S del ADNr (Emelianoff *et al.*, 2008). Se realizó el PCR en un

volumen total de reacción de 20 µl utilizando 2 µl de ADN genómico, 12 µl de super mix de Biorad®, 6 µl de agua libre de nucleasas y 1 µl de cada uno de los cebadores (391, 5'-AGCGGAGGAAAAGAACTAA-3' y 501, 5'-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3'), el producto esperado fue de ~ 1072 pb. La amplificación se realizó en un termociclador T100 marca Biorad® con el programa: desnaturalización inicial de 3 min a 94 °C, 35 ciclos con desnaturalización 94 °C por 1 min, anillamiento de 52 °C por 1 min, extensión de 72 °C por 1 min y finalmente una extensión prolongada de 72 °C por 10 min (Stock *et al.*, 2001).

Para amplificar la región SSU o 18S del ARNr (Floyd *et al.*, 2002) se realizó la PCR en un volumen total de reacción de 20 µl, utilizando 2 µl de ADN genómico, 12 µl de super mix de Biorad®, 6 µl de agua libre de nucleasas y 1 µl de cada uno de los cebadores; se utilizaron dos pares de cebadores (SSU18A, 5'-AAA GAT TAA GCC ATG CAT G-3' y SSU9R, 5'-AGC TGG AAT TAC CGC GGC TG-3') con el programa: desnaturalización inicial de 98 °C por 3 min, 26 ciclos de 98 °C por 10 s, 52 °C por 15 s, 72 °C por 40 s y 72 °C por 10 min (Ragsdale, 2014); y (SSUF07, 5'-AAAGATTAAGCCATGCATG-3' y SSUR26, 5'-CATTCTTGCAAATGCTTTCG-3') con el programa: desnaturalización inicial de 95°C por 6 min, 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 55 °C por 30 s, 72 °C por 1 min y una extensión final de 72 °C por 10 min (Pedram, 2008). Los programas se ejecutaron en un termociclador T100 de Biorad® y el producto esperado fue de ~ 1000 pb.

### **5.7.3. Electroforesis**

Los productos de PCR se corrieron en electroforesis con geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio 0.4 µg/90 ml (Orozco, 2008). Se utilizaron 7 µl de cada uno de los productos de PCR, 3 µl de marcador molecular 1 Kb de Promega® y 100 pb de Biorad®. Los geles se visualizaron en un fotodocumentador infinity-ST5 vilber loumat.

### **5.7.4. Secuenciación de los productos de PCR**

Los productos de PCR se enviaron a secuenciar a servicios MacroGen Korea (<http://www.macrogen.com/eng/>) en Seoul, Republica de Korea.

### **5.7.5. Edición de secuencias**

Las secuencias obtenidas se editaron con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor versión 7.2.5. Las secuencias consenso se sometieron a un análisis de similitud de secuencias con la herramienta bioinformática BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) en GenBank del National Center of Biotechnology Information (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) en donde se compararon las secuencias de este trabajo con las secuencias disponibles en la base de datos de nucleótidos. Se tomaron en cuenta las secuencias con mayor porcentaje de identidad (Robles, 2013).

### **5.7.6. Análisis filogenético**

Se descargaron secuencias preexistentes de la base (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) que estuvieran relacionadas con las secuencias de este estudio y que además pertenecieran a la misma región del gen amplificado. Las secuencias se descargaron en formato FASTA, fueron editadas y cargadas en el programa MEGA7 (Tamura *et al.*, 2011), se alinearon con las secuencias obtenidas en este trabajo para generar el árbol filogenético mediante un análisis UPGMA.

## **5.8. Pruebas de patogenicidad *in vitro* de los aislamientos de nematodos sobre insectos descortezadores**

Mediante el descortezado de trozas infestadas, se obtuvieron adultos del escarabajo y fueron determinados taxonómicamente como *Dendroctonus frontalis* Zimmerman por el Biól. San Marino Cid en el laboratorio de Sanidad Forestal del CENID-COMEF-INIFAP.

Se realizó un diseño completamente al azar con tres repeticiones con un tratamiento para cada cepa, se colocaron placas Petri con papel filtro Whatman No. 1, se inocularon los nematodos en dosis de 1000 juveniles infectivos/ml y se distribuyeron homogéneamente sobre el papel. Se colocaron 20 escarabajos por placa, teniendo un total de tres cajas por aislamiento más un control asperjado con agua potable estéril. Las placas Petri fueron incubadas a  $24 \pm 3$  °C en completa oscuridad durante un periodo de 96 h. Transcurridas 48 y 96 h, los insectos muertos fueron lavados con hipoclorito de sodio 0.5% durante 10 s y disectados para corroborar la muerte por nematodos (Fan, 2000).

Para determinar la mortalidad de los adultos de *D. frontalis*, los datos de cada experimento se registraron como porcentaje acumulativo. El análisis de los datos se realizó con un Modelo Lineal Generalizado (GLM) con distribución cuasibinomial. Las diferencias de los tratamientos fueron estimadas mediante una prueba de comparación de medias de Tukey utilizando el programa STATISTICA. La variable respuesta fue el porcentaje de mortalidad de los insectos y como variable categórica los aislamientos y el tiempo.

## **5.9. Reproducción de nematodos *in vitro***

Se utilizó un diseño completamente al azar con tres tratamientos y cinco repeticiones por tratamiento para cada cepa de nematodo. Se realizaron tres tratamientos colocando alimento artificial y alimento vivo: Tratamiento 1 (agar-agar 1%+ alimento para perro marca Cesar®), Tratamiento 2 (agar-agar 1%+ Paté de hígado de cerdo Zwan®) y Tratamiento 3 (larvas de *G. mellonella*). Para el caso de los tratamientos 1 y 2, se colocaron cinco réplicas en placas Petri con 20 ml de agar-agar, 3 g de alimento artificial e inoculando 100 nematodos juveniles obtenidos por tamizado en la malla 325, (Maceto, 2009).

En el tratamiento 3 se prepararon cinco réplicas, exponiendo individualmente en una cámara de infección larvas de *G. mellonella* con papel filtro humedecido y distribuyendo homogéneamente un ml de suspensión que contenía 100 nematodos juveniles; las larvas muertas fueron removidas y transferidas en una trampa White para coleccionar los juveniles infectivos que emergieron (Stock *et al.*, 2008).

En los tres tratamientos se contaron los nematodos a los tres y seis días, tomando como día uno la inoculación. Los tratamientos se incubaron en una cámara bioclimática (Alvarado, 2012).

Para evaluar el efecto de cada uno de los tratamientos, se realizó un GLM (Modelo Lineal Generalizado) con distribución Poisson en el programa STATISTICA, se utilizó como variable de respuesta el número de nematodos obtenidos y como variables categóricas el tipo de alimento y el tiempo transcurrido. Las diferencias de los tratamientos se estimaron mediante una prueba de comparación de medias de Tukey.

### **5.9.1.    Conteo de nematodos**

Para recuperar los nematodos de los medios de reproducción del tratamiento 1 y 2, se colocaron en una licuadora convencional dando dos ciclos de 4 s, se filtraron en un tamiz de 400 mallas (Maceto, 2009) manteniendo una suspensión de 25 ml. Para el caso del tratamiento 3 se mantuvo el agua de la trampa White en el mismo volumen.

Se utilizó el método de recuento por dilución (Stock *et al.*, 2008). Se homogenizaron las suspensiones durante 30 s y se tomó una alícuota de 1 ml que se llevó a una cámara de recuento. Se contaron los nematodos vivos bajo un microscopio estereoscópico. Se repitió el recuento utilizando cuatro alícuotas por muestra. Se calculó la media de las alícuotas por muestra y se multiplicó por el volumen total de la suspensión (Coyne, 2007).

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Aislamiento de nematodos entomopatógenos

Para el estado de Querétaro se realizaron un total de nueve muestreos en los meses de abril a agosto 2014 y abril a septiembre 2015, se obtuvieron un total de 18 muestras, de las cuales se aislaron de suelo de bosque de pinos, cuatro cepas de posibles nematodos entomopatógenos (Cuadro 3). Para Aguascalientes se realizó un muestreo en el mes de junio 2015 debido a que durante el recorrido no se detectaron pinos por el intensivo saneamiento en la zona del municipio de San Juan de Gracia, se contabilizaron seis muestras de suelo, de las cuales se aisló una cepa con características de nematodos entomopatógenos (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Aislamientos de nematodos de Querétaro y Aguascalientes

ESTADO	PARAJE	POBLACIÓN DE NEMATODOS	CÓDIGO	AISLADO	FECHA DE COLECTA
Querétaro	La Gachupina	1	GMA6	Suelo	30/junio/2014
Querétaro	Campo Santo	1	CGA7	Suelo	31/julio/2014
Querétaro	El Tejamanil	1	TMA2	Suelo	29/abril/2015
Querétaro	Entrada al Madroño	1	MMO9	Insecto/ <i>Ips lecontei</i>	28/mayo/2014
Aguascalientes	Las Manzanillas	1	AS116	Suelo	23/junio/2015

## 6.2. Identificación taxonómica

### 6.2.1. Descripción de las cepas TMA2, CGA7 y GMA6

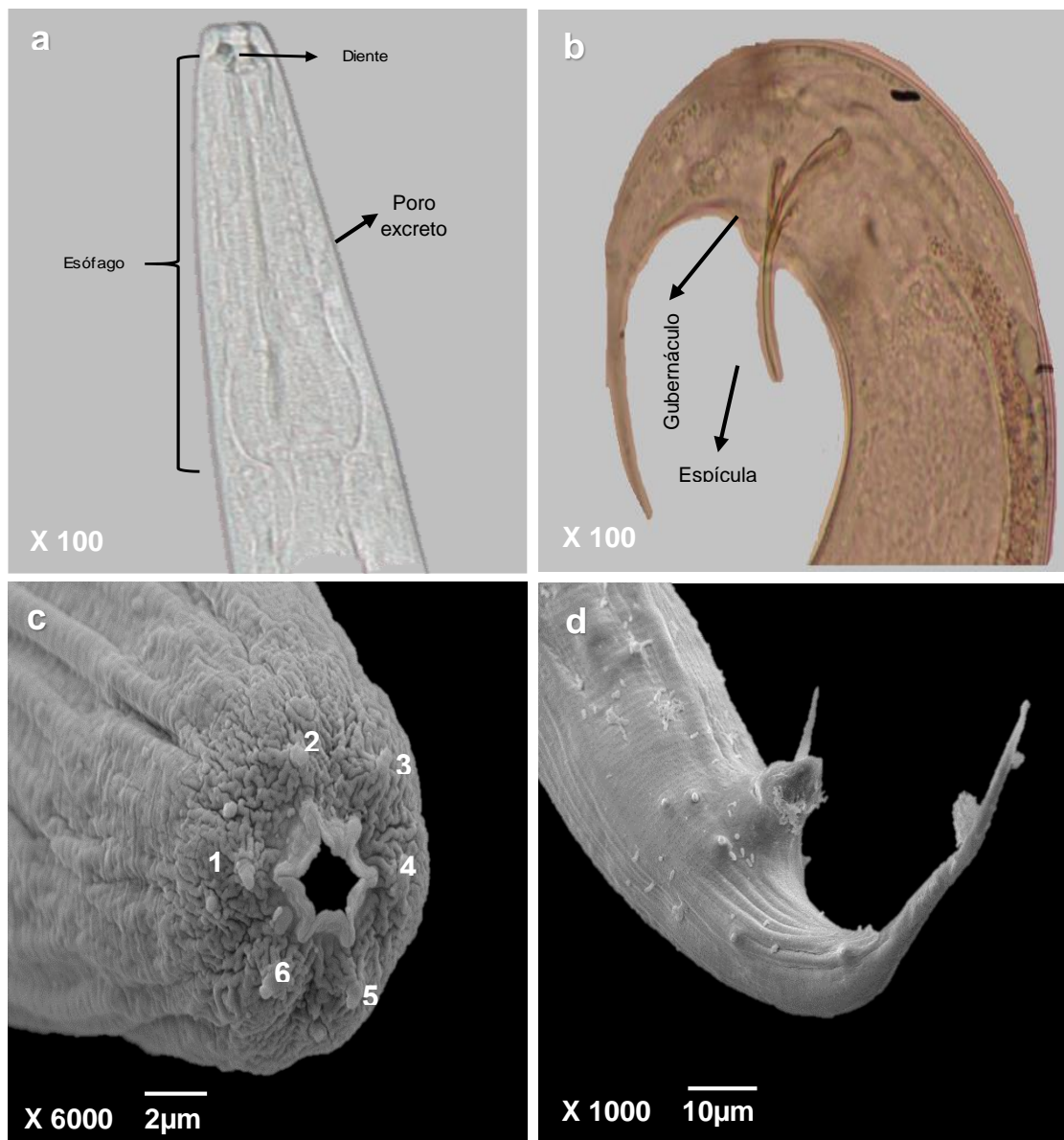
#### 6.2.1.1. Cepa TMA2

**Macho.** Nematodos de color blanco, parte ventral del cuerpo arqueada cuando mueren por calor. El cuerpo es delgado y alargado con una longitud que va de 1009 a 1353  $\mu\text{m}$  (Cuadro 4). La cutícula es anillada, con estrías longitudinales y campo lateral difícil de distinguir. La cabeza es ligeramente redondeada y presenta seis papilas labiales (Figura 5c). El estoma es ancho y asimétrico, en el metastoma se observa una elevación dorsal sobre la que se asienta un diente en forma de garra (Figura 5a).

La longitud del esófago es de 93 a 117.2  $\mu\text{m}$  con un procorpus cilíndrico y musculoso que ocupa dos tercios del diámetro del cuerpo, el metacorporus es muscular de forma ovoide, el istmo es alargado, estrecho y no muscular, el bulbo basal de forma glandular, el anillo nervioso rodeando el istmo a media región. El poro excretor se ubica en la porción media del esófago (Figura 5a).

Presenta una espícula en forma de hoz estrecha con una longitud de 47 a 57.4  $\mu\text{m}$ , el gubernáculo es delgado y similar en su forma la espícula con una longitud de 21.2 a 24.3  $\mu\text{m}$  (Figura 5b). Se observan siete pares de papilas genitales distribuidas en la siguiente forma: dos pares precloacales y seis post cloacales. La cola es de forma cónica que se adelgaza progresivamente hasta terminar en forma de látigo (Figura 5d).





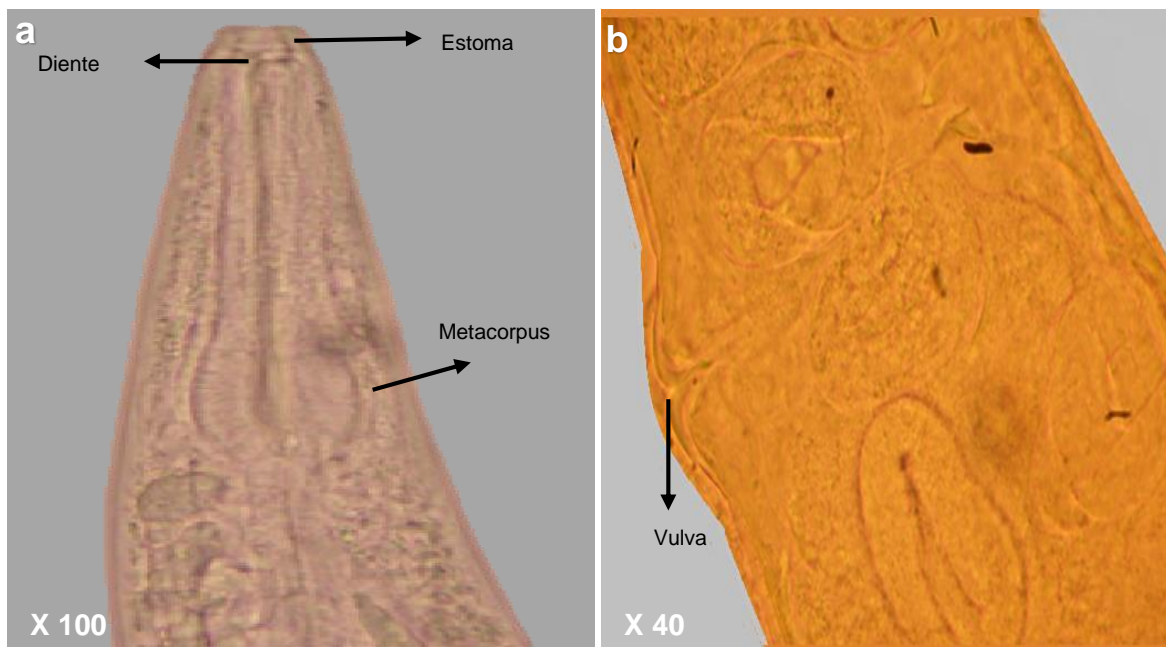
**Figura 5.** Región anterior (a y c) y posterior (b y d) de un macho de la cepa TMA2. (a) Estoma ancho con un diente dorsal, esófago típico rhaditoide, (b) Vista lateral de la espícula y gubernáculo, (c) Abertura del estoma, seis papilas labiales, (d) papilas genitales.

**Hembra.** Los ejemplares son de color blanco, largos y gruesos, que muestran forma de “S” al morir. Son similares al macho, pero son más grandes con una longitud total que va de 1256 a 1508.3  $\mu\text{m}$  (Cuadro 4). La cutícula es delgada y finamente anillada, presentan estriación longitudinal a lo largo de todo el cuerpo. La cabeza es ligeramente redondeada, la región anterior tiene seis papilas labiales, cuatro papilas cefálicas y una abertura anfídial

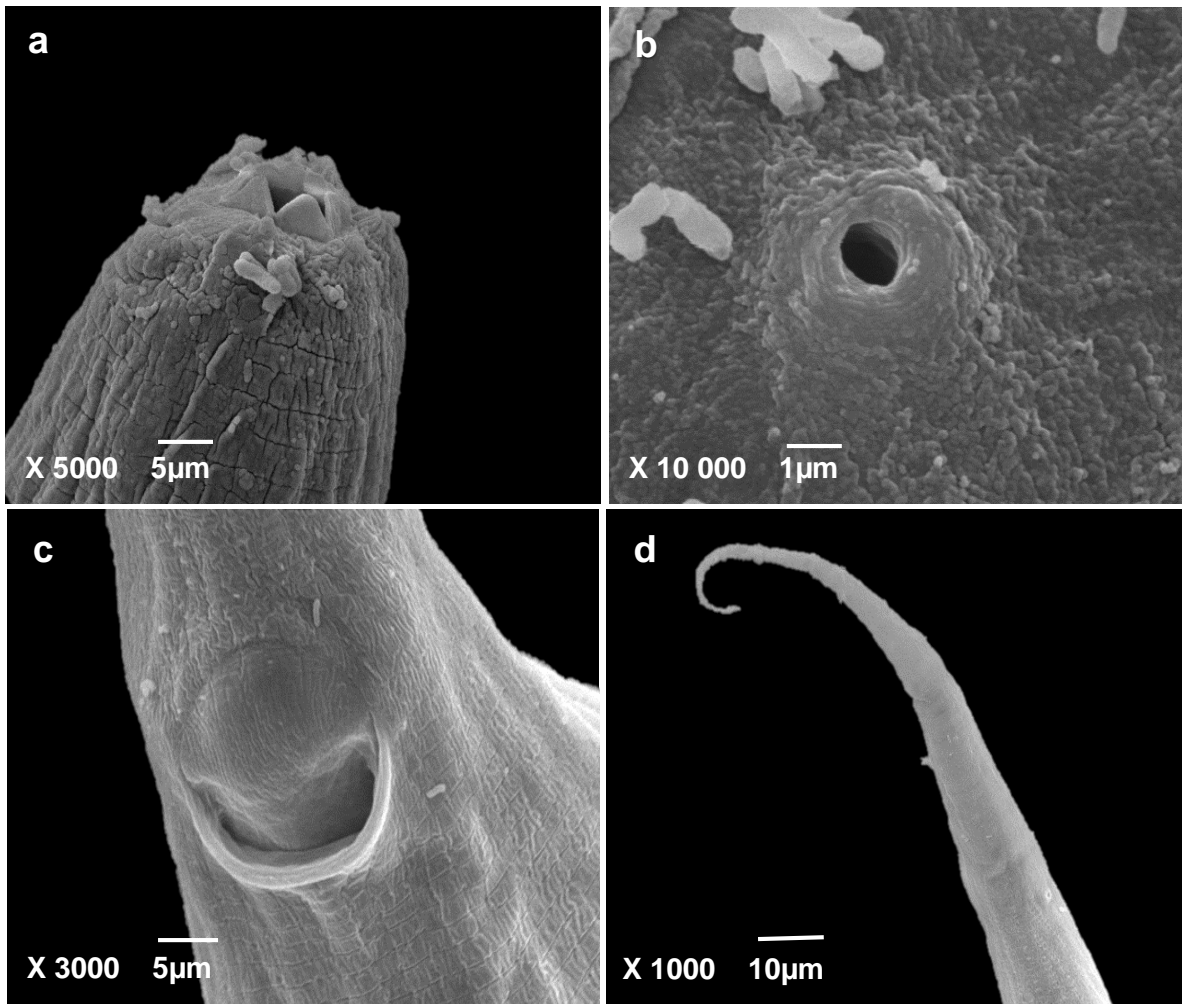
elíptica (Figura 7a). El estoma ancho y asimétrico, en el metastoma se asienta un diente en forma de garra (Figura 6a).

La longitud del esófago va de 105.9 a 122.3  $\mu\text{m}$  con procorpus cilíndrico y muscular, bulbo medio en forma ovoide, el istmo es alargado y grueso, el bulbo terminal es de tipo glandular (Figura 6a). El poro excretor se ubica en la parte media del esófago (Figura 7b).

Son didélficas, anfidélficas, presentan endotoquía matricida. La vulva se encuentra entre el 45-52% de la longitud total del cuerpo (Figura 6b). La cola es de forma cónica que se adelgaza progresivamente hasta terminar en forma de látigo (Figura 7d).



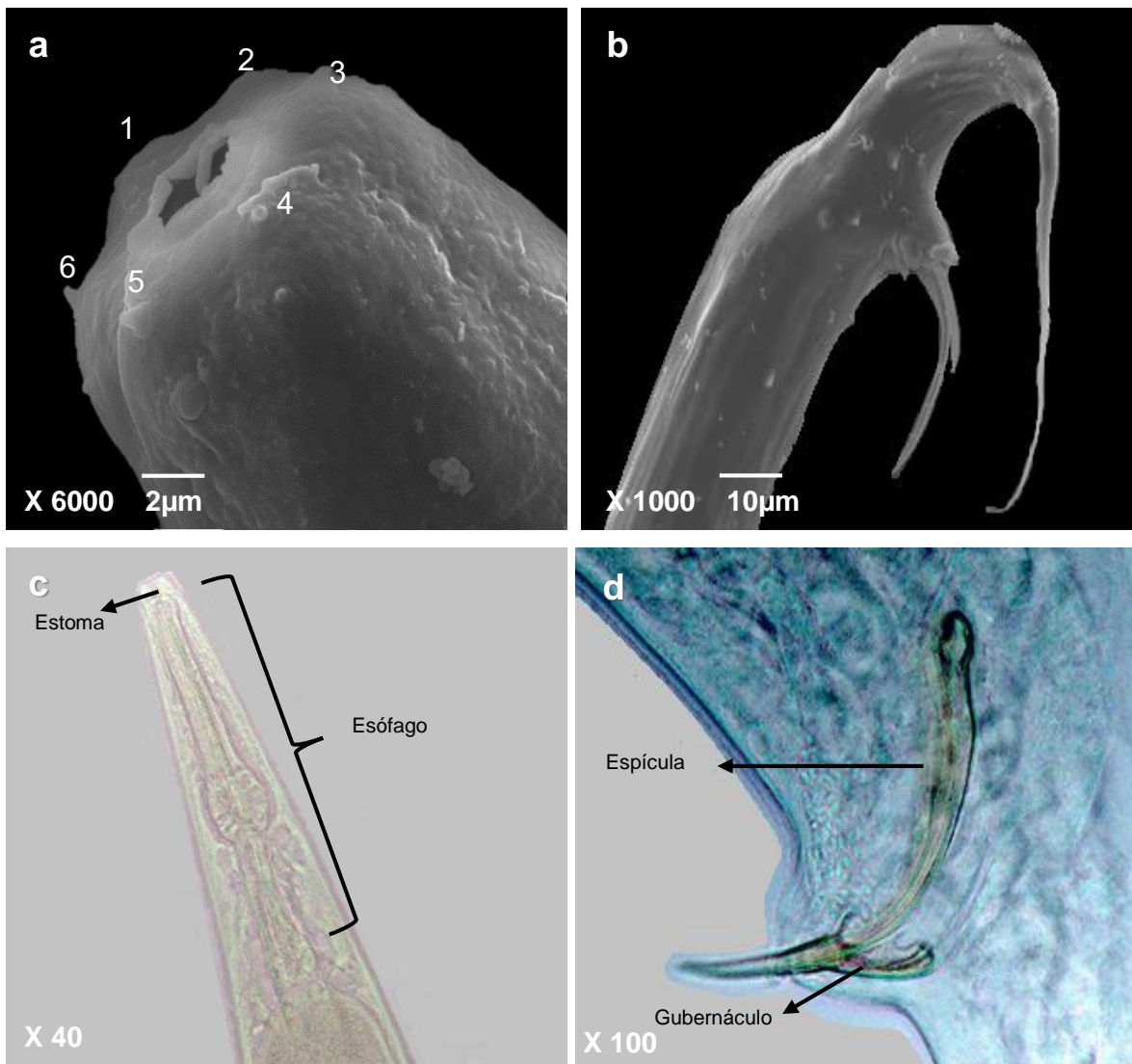
**Figura 6.** Primera generación de la cepa TMA2 en microscopia de luz. (a) región cefálica de hembra proyectándose el estoma, un diente dorsal y bulbo esofágico, (b) Región anterior, vista lateral de la vulva.



**Figura 7.** Hembra de *Pristionchus americanus* cepa TMA2 en microscopía electrónica de barrido (a) Región anterior mostrando la distribución de papilas. (b) Poro excretor. (c) Región posterior mostrando ano y (d) Región posterior mostrando la cola en forma de látigo.

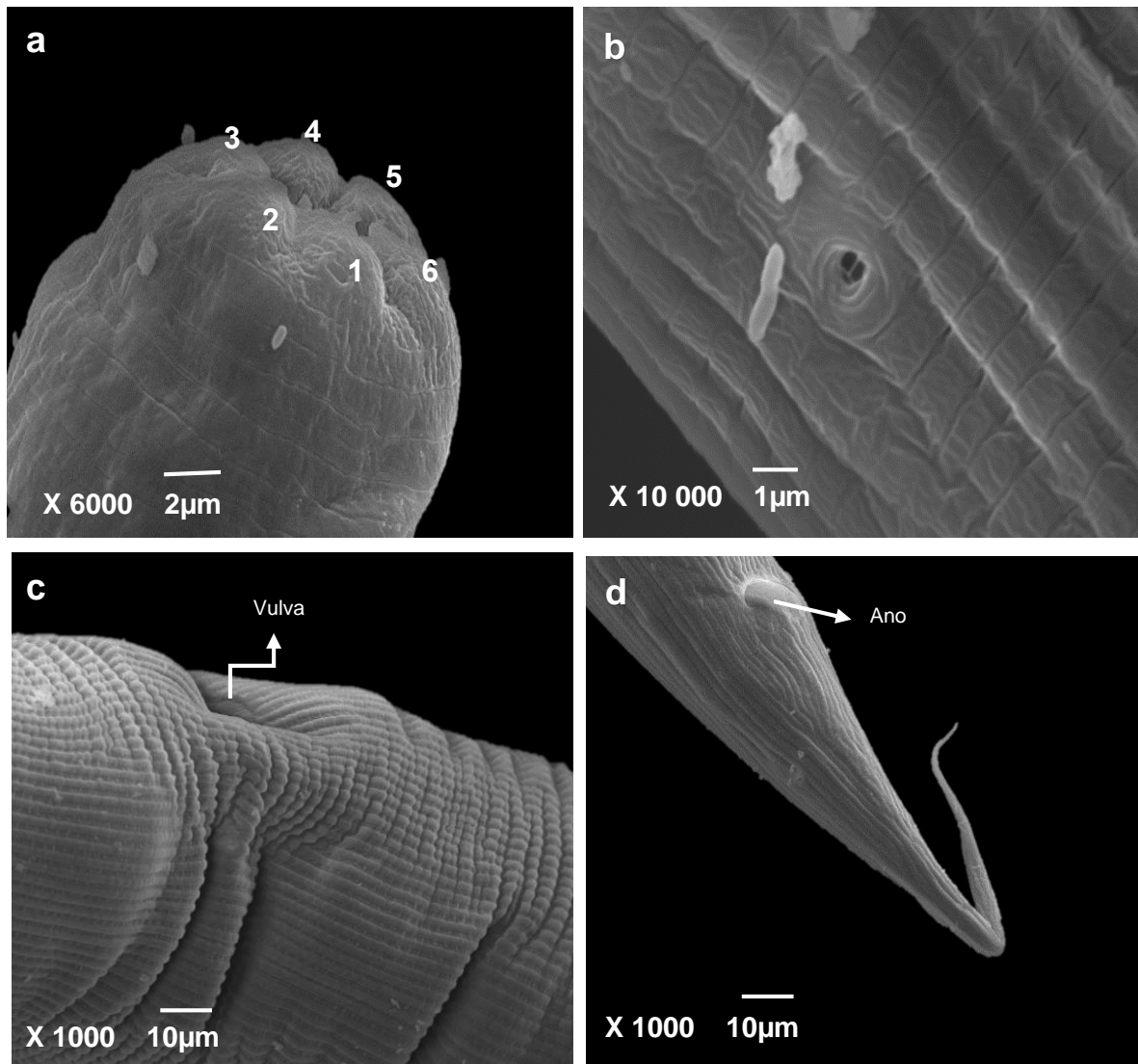
#### 6.2.1.2. Cepa CGA7

**Machos.** La descripción coincide con las características mencionadas para la cepa TMA2 (Figura 8a, b, c y d). La longitud del cuerpo (987-1319.2  $\mu\text{m}$ ) no muestra mucha variación, comparados con la cepa TMA2. No solo el largo del cuerpo es muy similar, sino también la longitud de las espículas (45.7-57.1  $\mu\text{m}$ ) y el gubernáculo (20.1-23.6  $\mu\text{m}$ ). Los valores máximos y mínimos se encuentran muy cercanos entre sí (Cuadro 4).



**Figura 8.** Región anterior de un macho de la cepa CGA7 (a y c). Región posterior (b y d). (a) Papilas labiales, (b) Disposición de papilas genitales, (c) Estoma y esófago típico de *P. americanus*, (d) Vista lateral de la espícula y el gubernáculo.

**Hembra.** La descripción de la cepa CGA7 coincide con todas las características morfológicas (Figura 9a, b, c y d) y morfométricas de las hembras del aislamiento TMA2, sin embargo, los valores máximos y mínimos de la longitud del cuerpo muestran que son ligeramente más largas (1187-1719.4 µm); el ancho máximo del cuerpo (90.1-142.1 µm), la distancia del extremo anterior al poro excretor (72.2-144.3 µm), ancho de la cola a nivel del ano (37.1-54.9 µm) también mostraron poca variación (Cuadro 4).

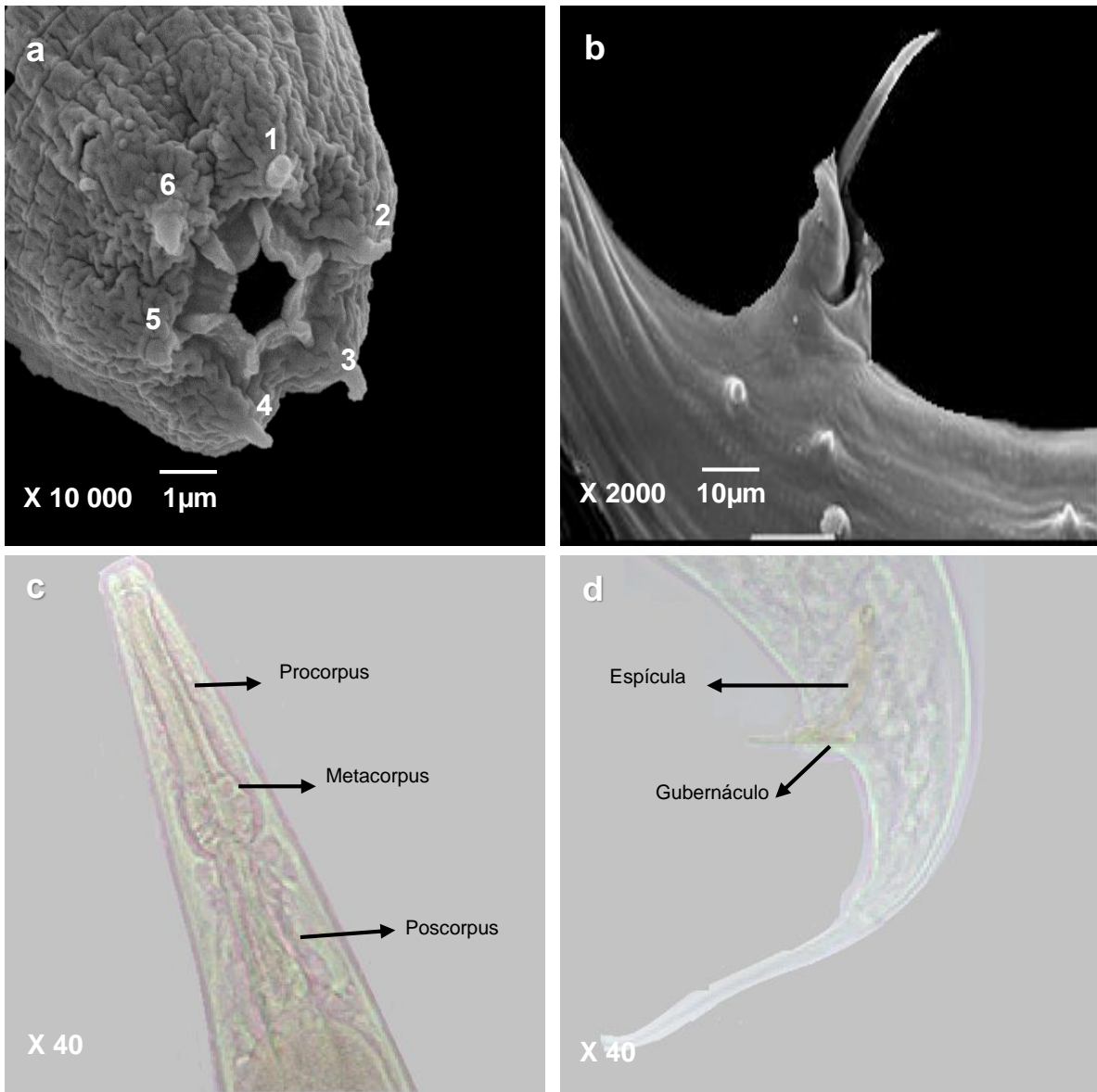


**Figura 9.** Hembra de la cepa CGA7 en microscopía electrónica de barrido de. (a) Papilas labiales, (b) Poro excretor), (c) vulva, (d) Vista ventral de la región posterior se observa el ano y la cola en forma de látigo.

## Cepa GMA6

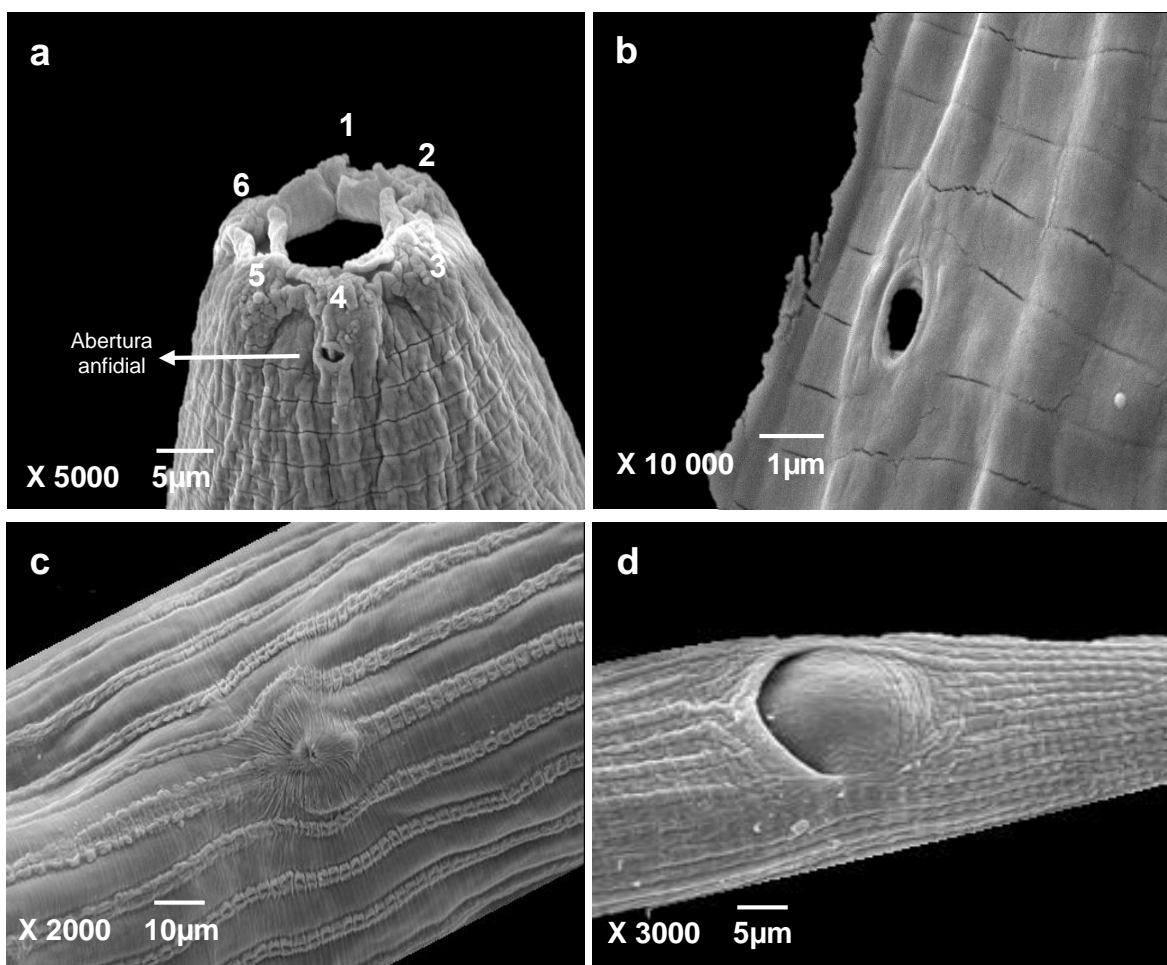
### 6.2.1.3. Cepa GMA6

**Macho.** Las características morfológicas son similares a las dadas para la cepa TMA2 y se muestran en la figura 10a, b, c y d. La longitud total del cuerpo (1102.2-1329.7  $\mu\text{m}$ ) muestra que esta cepa es ligeramente más pequeña. Los valores máximos y mínimos de la espícula (45-56  $\mu\text{m}$ ) y el gubernáculo (19-24  $\mu\text{m}$ ) se encuentran muy próximos entre sí (Cuadro 4).



**Figura 10.** Región anterior (a y c), región posterior (b y d). (a) Papilas labiales y abertura del estoma, (b) Papilas genitales, (c) Esófago típico con procorpus, metacarpus y poscorpus, (d) Vista lateral de la espícula y gubernáculo en forma de hoz, cola alargada.

**Hembra.** Las características morfológicas (Figura 11a, b, c y d) y morfométricas del aislado GMA6 concuerdan con las hembras de la cepa TMA2, sin embargo, la longitud máxima y mínima del cuerpo mostro que son ligeramente más largos (1176-1608  $\mu\text{m}$ ); medidas como el ancho máximo del cuerpo (89.7-138.5  $\mu\text{m}$ ), la distancia del extremo anterior al poro excretor (89.7-138.5  $\mu\text{m}$ ), ancho de la cola a nivel del ano (37.7-55.9 $\mu\text{m}$ ) también mostraron escasa variación (Cuadro 4).



**Figura 11.** Microscopia electrónica de barrido. (a) Región cefálica con seis papilas cefálicas y abertura anfidial elíptica, (b) Poro excretor, (c) Vulva y estriación longitudinal, (d) Vista ventral del ano.

**Cuadro 4.** Características morfométricas para las cepas TMA2, CGA7 y GMA6 (en  $\mu\text{m}$ )

MEDIDAS	Población TMA2		Población CGA7		Población GMA6		<i>P. americanus</i> RS 5140 Herrmann et. al. (2006a)	
	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho
<b>N</b>	15	15	15	15	15	15	*	*
<b>(L) longitud total del cuerpo</b>	1256-1508.3	1009-1353	1187-1719.4	987-1319.2	1176-1608	1102.2-1329.7	882-1510	938-1392
<b>(A) anchura total del cuerpo</b>	92.4-138.4	72.6-122.6	90.1-142.1	71.2-123	89.7-138.5	69.8-119.6	92-141	73-125
<b>(PE) distancia del extremo anterior al poro excretor</b>	73-142.5	65.7-124.3	72.2-144.3	65-129.4	75.9-146.7	65.2-132	*	*
<b>(ES) longitud del esófago</b>	105.9-122.3	93-117.2	107-121.2	92.7-115.3	109.3-123.2	92-116	101-121	90-115
<b>ancho de la cola a nivel del ano/cloaca</b>	37.9-54.6	32.7-64.1	37.1-54.9	34.2-63	37.7-55.9	34.7-62.2	38-55	35-59
<b>longitud de la espícula</b>	*	47-57.4	*	45.7-57.1	*	45-56	*	46-57
<b>longitud del gubernáculo</b>	*	21.2-24.3	*	20.1-23.6	*	19-24	*	20-24
<b>a (L/A)</b>	9.5-10.8	11-15.1	9.8-10.6	10.7-15.4	9.7-11.6	11.1-15.7	9.5-10.7	11.1-12.8
<b>b (L/ES)</b>	8.3-12.3	11.5-16.7	8.2-12.5	11.4-15.4	8.0-13	11.9-11.4	8.7-12.4	10.4-12.1
<b>c (PE/ES)</b>	0.6-1.1	0.7-1	0.6-1.1	0.7-1.1	0.6-1.1	0.7-1.1	*	*

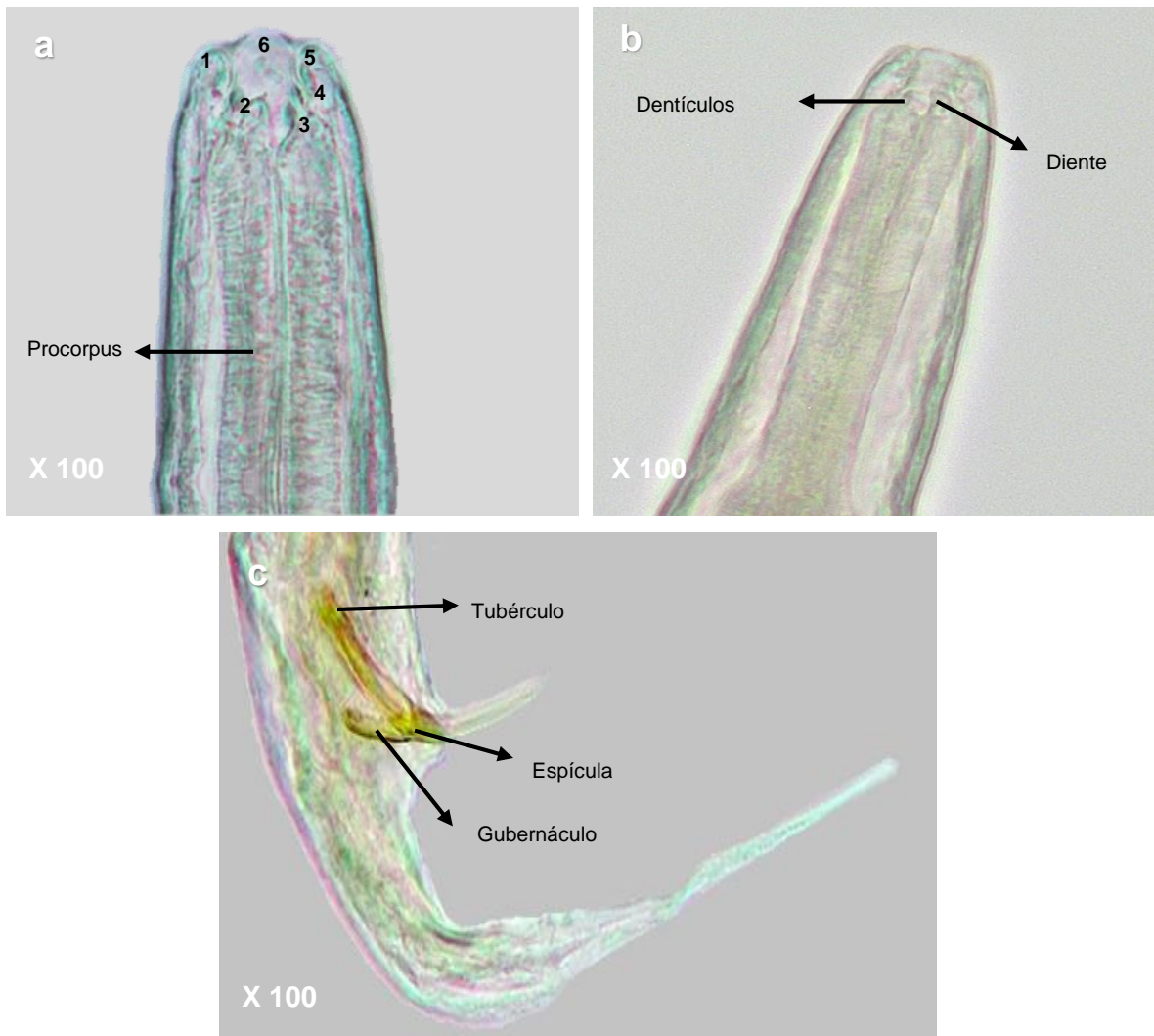


### 6.2.2. Descripción de la cepa MMO9

**Macho.** Son nematodos de color blanco, al morir por calor tienen forma de “j”. Tienen una longitud total del cuerpo de 1121 a 1138.2  $\mu\text{m}$  (Cuadro 5) La región cefálica es redondeada, posee cuatro sensilas cefálicas y seis papilas cefálicas cortas y poco visibles (Figura 12a). Tienen una anfidia elíptica.

Exhiben un estoma tubular más largo que ancho y en el lado dorsal del estegostoma presentan un diente y dentículos (Figura 12b). El procorpus ocupa dos terceras partes del diámetro del cuerpo, el bulbo medio con válvula (Figura 12a). El istmo es medianamente estrecho con el anillo nervioso por lo general en la parte media baja del istmo. Poro excretor al extremo de la faringe.

Presentan un solo testículo y el par de espículas tienen forma arqueada por separado en forma de “Y” que tienen una longitud con un valor máximo y mínimo de 58.2-60  $\mu\text{m}$ , tiene unos pequeños tubérculos a cada lado de las espículas. El gubernáculo tiene forma de “reja del arado” con una longitud de 24.8-25.4  $\mu\text{m}$  (Figura 12c). En el extremo posterior tiene nueve pares de papilas genitales, tres pares preanales y seis pares postanales. Tiene un par de fásmidios entre las papilas genitales. La cola es conoide más alargada que en la hembra. Bursa ausente.

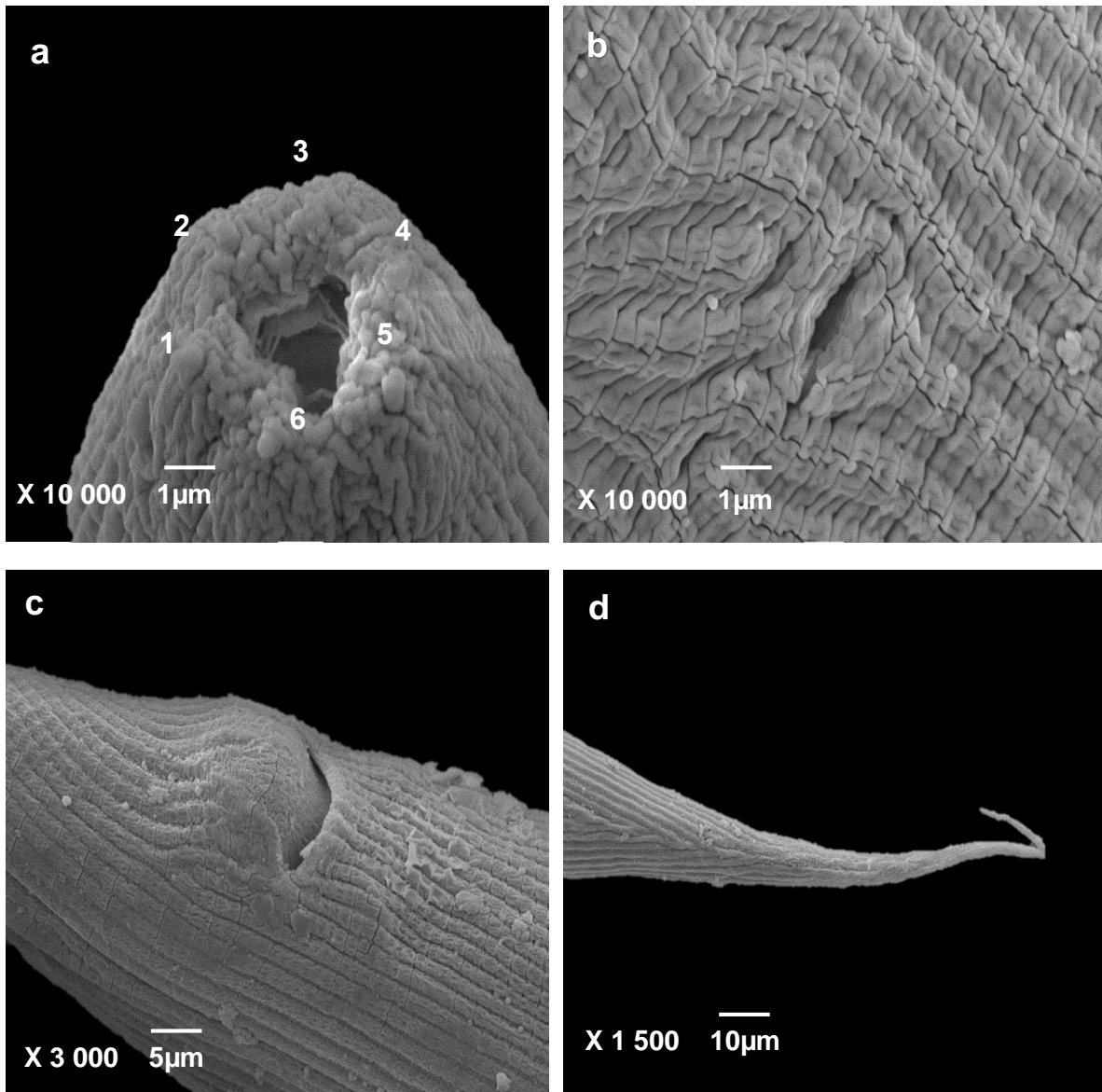


**Figura 12.** Macho de la cepaa MMO9 en microscopia de luz. (a) Región anterior con seis papilas labiales, procorpus. (b) Metastoma con diente y dentículo. (c) Región posterior, espícula en forma de “Y”, gubernáculo en forma de reja del arado y cola conoide y alargada.

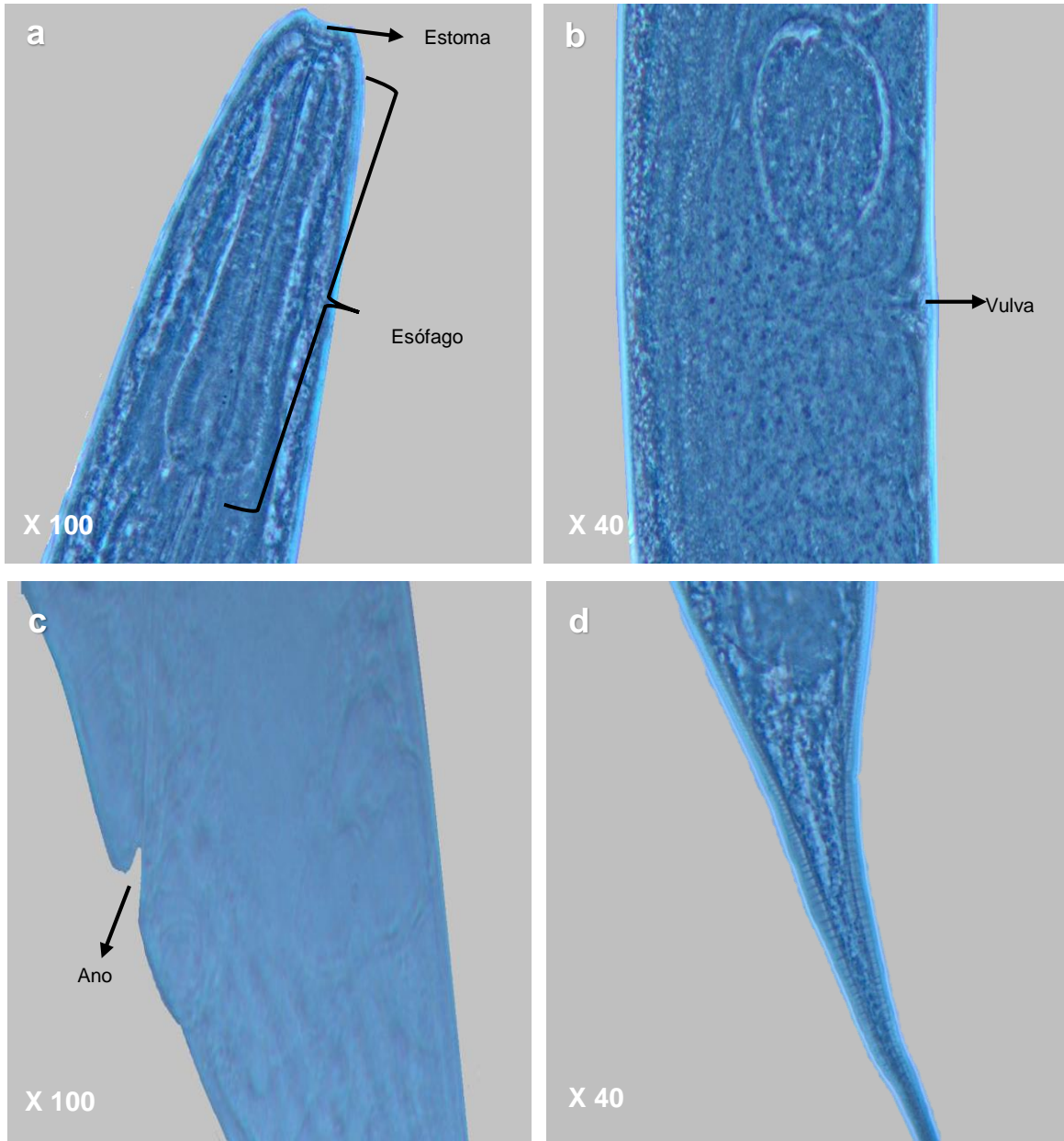
**Hermafrodita.** Nematodos de color blanco. Tiene una cutícula con estrías longitudinales, subyacidas por filas de pequeños puntos y filas de barras transversales (Figura 13b). Son de mayor tamaño que los machos con una longitud total del cuerpo con una valor máximo y mínimo de 1397 y 1432  $\mu\text{m}$  (Cuadro 5). Esta población presenta una región cefálica redondeada, con seis papilas cefálicas y una anfidia elíptica (Figura 13a).

El estoma es tubular más largo que ancho, en el estegostoma dorsal se presenta un diente y dentículos. El esófago es similar al del macho pero más alargado con una medida de 145-156  $\mu\text{m}$  (Figura 14a). El poro excretor se encuentra al extremo de la faringe.

Son didélficas, la vulva se encuentra en el 50% de la longitud total del cuerpo con una visible protuberancia. Parte del oviducto está diferenciado como una espermateca, separado del ovario y útero por una sección estrecha (Figura 14b). Exhiben endotoquia matricida. La cola es relativamente corta y conoide (Figura 13d y 14d).



**Figura 13.** Microscopia electrónica de barrido de hermafrodita de la cepa MMO9. (a). Región cefálica con seis papilas cefálicas, (b) Cutícula con estrías y poro excreto, (c) Vista lateral del ano, (d) Cola conoide.



**Figura 14.** Hermafrodita de la cepa MMO9 en microscopia de luz (a) Región anterior, esogafo y estoma similar al macho. (b) Región vulvar. (c) ano (d) Cola conoide.

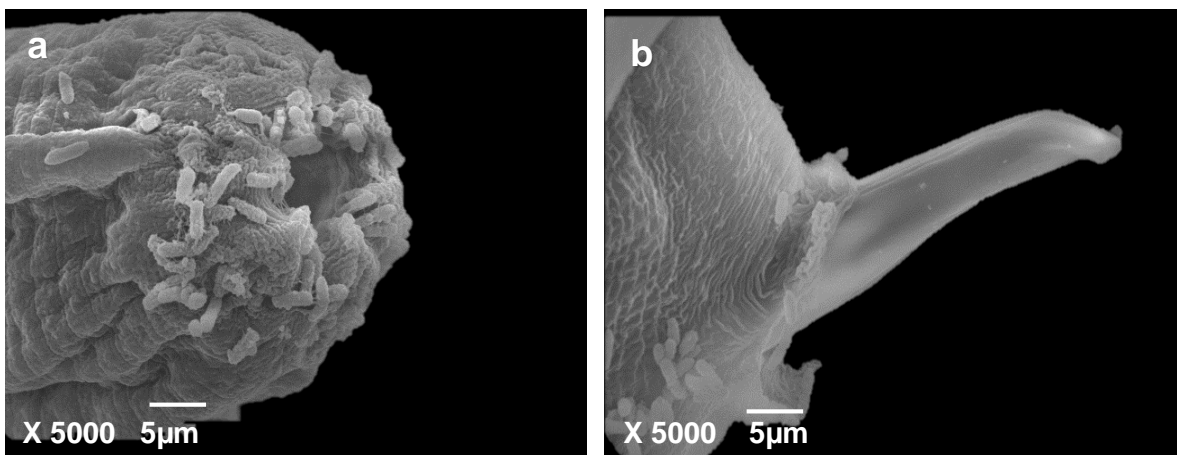
**Cuadro 5.** Características morfométricas para la cepa MMO9 (en  $\mu\text{m}$ )

MEDIDAS	Población MMO9		<i>Diplogasteroides magnus</i> . Kreft (2012)	
	Hembra	Macho	Hermafrodita	Macho
<b>N</b>	15	15	15	15
<b>(L) longitud total del cuerpo</b>	1397-1432	1121-1138.2	1406.7	1133.3
<b>(A) anchura total del cuerpo</b>	82-92	55.9-56.7	83.7	56.1
<b>(PE) distancia del extremo anterior al poro excretor</b>	202-207	191.2-200.2	205.9	190.9
<b>(ES) longitud del esófago</b>	145-156	128.1-129.4	147	129.2
<b>Distancia del extremo anterior al anillo nervioso</b>	176-178.2	157.2-158.3	177.8	157.8
<b>Longitud de la cola</b>	141.3-144.5	108.9-111.1	142.5	109.6
<b>Ancho de la cola a nivel del ano/cloaca</b>	37.4-39.3	37.2-38.7	38.6	38.4
<b>Ancho del cuerpo a nivel de la vulva</b>	50.9-52.3	*	51.3	*
<b>Longitud de la espícula</b>	*	58.2-60	*	59.1
<b>Longitud del gubernáculo</b>	*	24.8-25.4	*	25.2
<b>a (L/A)</b>	15.5-17.1	18.22-20.9	16.9	20.3
<b>b (L/ES)</b>	5-6.7	4.8-5.6	6	5.5
<b>c (PE/ES)</b>	8.2-10.5	7.9-10.3	10	10.4

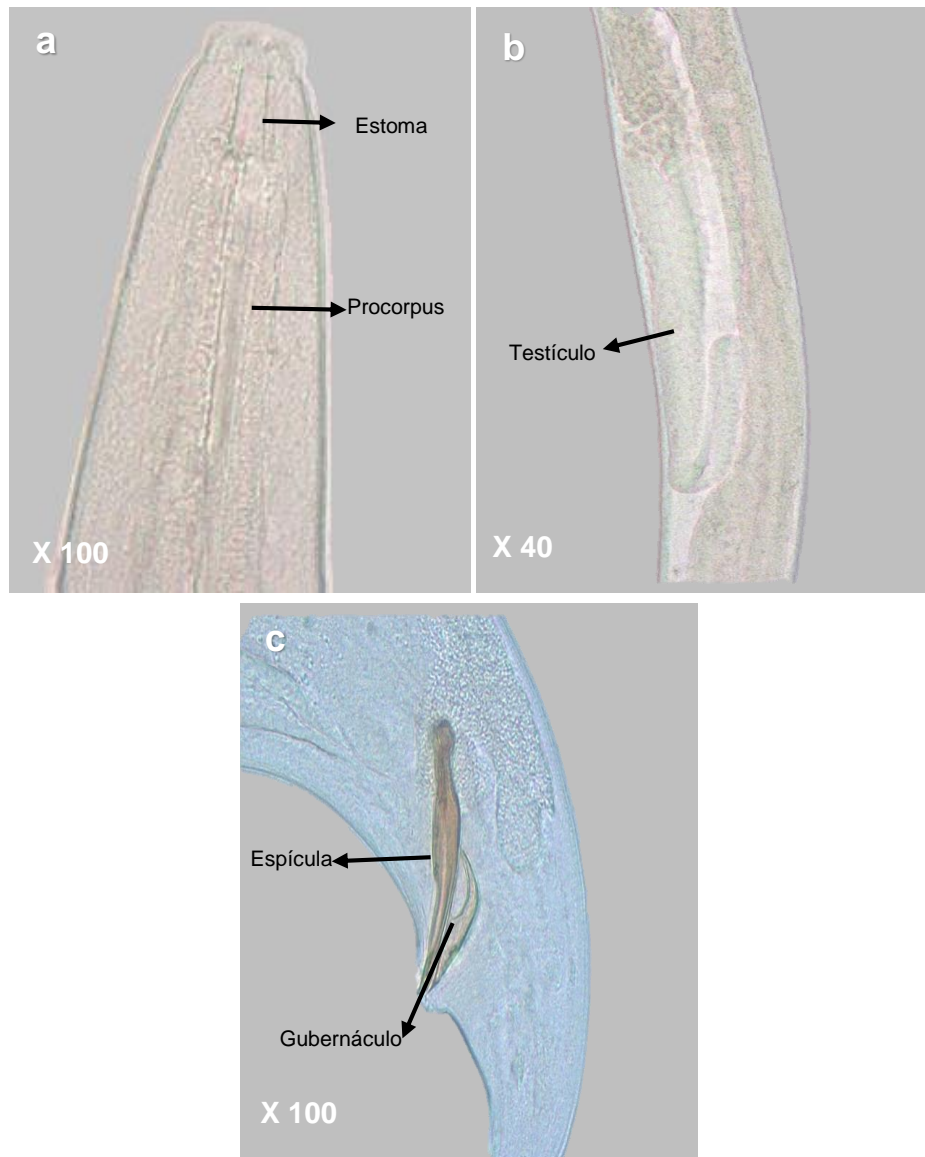
### 6.2.3. Descripción de la cepa AS116

**Macho.** Son nematodos de color blanco, adoptan forma de “J” al morir. Poseen una longitud total del cuerpo con un valor máximo y mínimo de 1037-1603  $\mu\text{m}$  (cuadro 6). La cutícula es ligeramente engrosada provista de pequeños puntos dispuestos en transversal y longitudinal. La región cefálica presenta seis papilas labiales (Figura 15a). Presenta un estoma tubular con paredes que difieren en longitud, tienen un collar en la faringe que envuelve un 59% de la longitud del estoma (Figura 16a). El esófago es típicamente rhabditoide, con un procorpus, metacarpus y postcorpus.

Exhiben un testículo reflejado y dos grandes glándulas eyaculatorias que se encuentran ventral a los testículos (Figura 16b). Las espículas son de color amarillo-marrón, no fusionadas (Figura 15b y 16c), sin diferencias en su longitud (48.7-63.5  $\mu\text{m}$ ); el gubernáculo es muy curvado correspondiente al 52% aproximadamente de la totalidad de longitud de las espículas (Figura 16c). Presentan una bursa abierta de tipo leptoderan y tienen un velum rudimentario, diez pares de papilas de diferente longitud dispuestas radialmente, papilas 1, 2 y 3 en posición precloacal del lado ventral del cuerpo, papilas 5 y 8 alcanzan el borde de la bursa, las papilas restantes (4, 6, 7, 9,10) levantadas en una posición ventral, el final de la cola sobresale más allá de la bursa.



**Figura 15.** Macho de la cepa AS116 en microscopía electrónica de barrido. (a) Región cefálica con presencia de bacterias, (b) Vista lateral de la espícula.

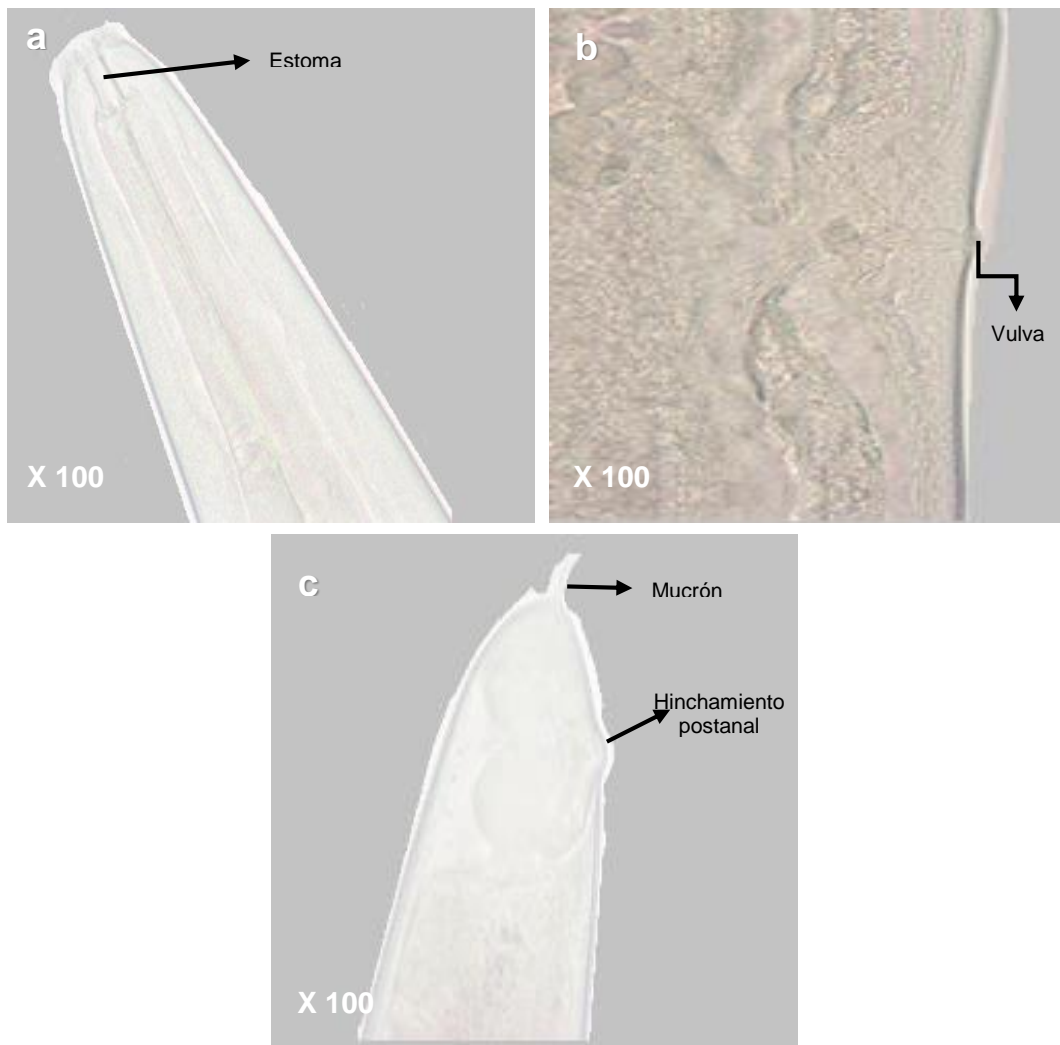


**Figura 16.** Macho de la cepa AS116 con microscopía electrónica de barrido. (a) Estoma asimétrico y procorpus muscular, (b) Testículo reflejado, (c) Vista lateral de la espícula y el gubernáculo.

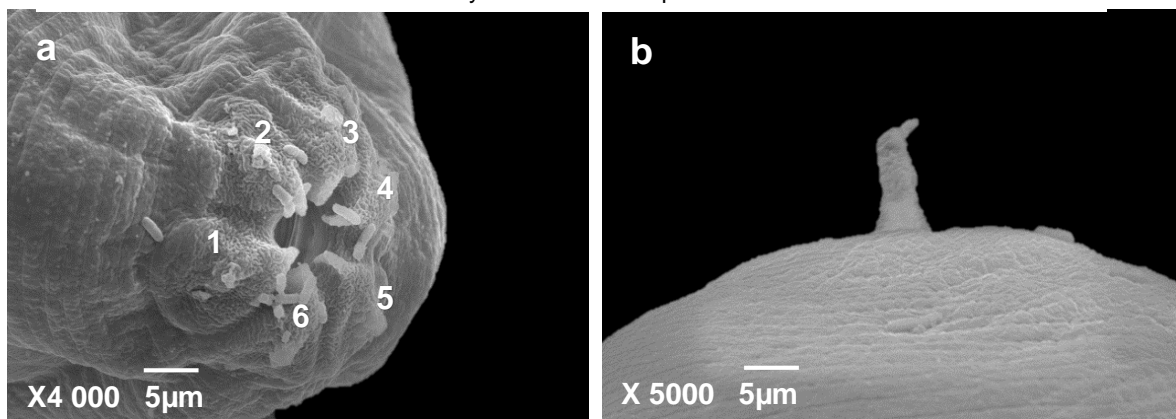
**Hembra.** Son de color blanco, con movimientos lentos y colapsan fácilmente bajo el cristal del cobre objetos. Son considerablemente más grandes que los machos con un valor máximo y mínimo de la longitud total del cuerpo de 1119.2-2113  $\mu\text{m}$ , en general los valores de sus características morfométricas son más elevados que en los machos (cuadro 6). Las hembras presentan características morfológicas similares a los machos (Figura 17a y 18a).

Son didélficas, anfidélficas. Además, poseen dos células grandes visibles en el entorno del poro cervical. La vulva se encuentra en la parte central del cuerpo (Figura 17b).

Son ovovivíparas y presentan endotoquía matricida. La cola tiene una terminación en cúpula con un mucrón (Figura 17c y 18b)



**Figura 17.** Hembra de la cepa AS116 en microscopia de luz (a) Región anterior, estoma tubular asimétrico, estoma tipo rhaditoide, (b) Vista ventral de la vulva, (c) Región posterior con vista ventral del ano y el hinchamiento postanal.



**Figura 18.** Hembra de la cepa AS116 en microscopia electrónica de barrido. (a) Región anterior con seis papilas cefálicas, ((b) región posterior en forma de cúpula con mucrón.

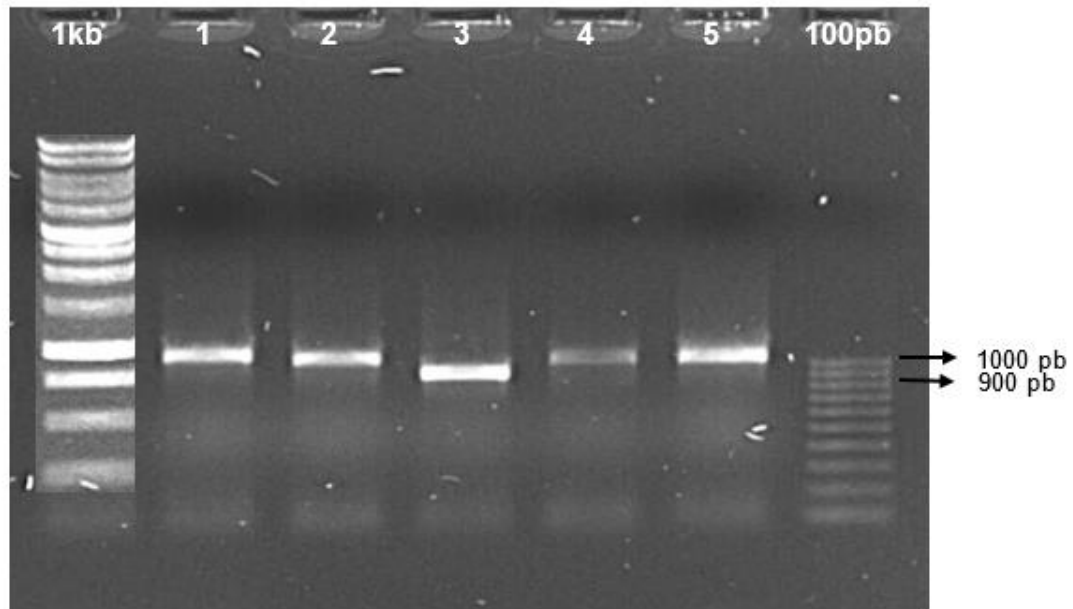


**Cuadro 6.** Características morfométricas para la cepa AS116 (en  $\mu\text{m}$ ).

Medidas	Población AS116		<i>Rhabditis (Rhabditoides) Regina</i> Schulte y Poinar (1991)	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
<b>N</b>	15	15	25	25
<b>Longitud del cuerpo</b>	1119.2-2113	1037-1603	1 100-2115	1 035-1 620
<b>Anchura total del cuerpo</b>	70.6-154.3	62.4-98.7	68-153	63-69
<b>Longitud de la cola</b>	54.4-68.2	55.3-87.9	41-72	54-90
<b>Longitud de la espícula</b>	*	48.7-63.5	*	50-63
<b>Longitud del gubernáculo</b>	*	28.1-35.8	*	27-36
<b>A</b>	10.9-20.1	15.9-20.7	10.3-19.8	16.4- 21.2
<b>B</b>	3.4-8.1	4.3-6.2	3.5-7.6	4.0-6.0
<b>C</b>	18.9-30.2	16.1-28.6	19.8-29.3	15.5-29.5

### 6.3. Identificación molecular

La identificación molecular de las cepas de nematodos TMA2, CGA7, GMA6 y AS116, amplificaron un producto de aproximadamente 1000 pb y 900 pb para la cepa MMO9 (Figura 19).



**Figura 19.** Amplificación del producto de PCR. Marcadores moleculares (1 kb y 100pb), (1) Cepa TMA2 *Pristionchus americanus*, (2) Cepa CGA7 *Pristionchus americanus*, (3) Cepa MMO9 *Diplogasteroides magnus*, (4) Cepa GMA6 *Pristionchus americanus* y (5) Cepa AS116 *Rhabditoides regina*.

### Secuenciación y alineamiento

Las cepas secuenciadas TMA2, CGA7, GMA6 y MMO9, se compararon en la base de datos GenBank e indicaron una homología del 99% respectivamente y para AS116 con el 100% (Cuadro7).

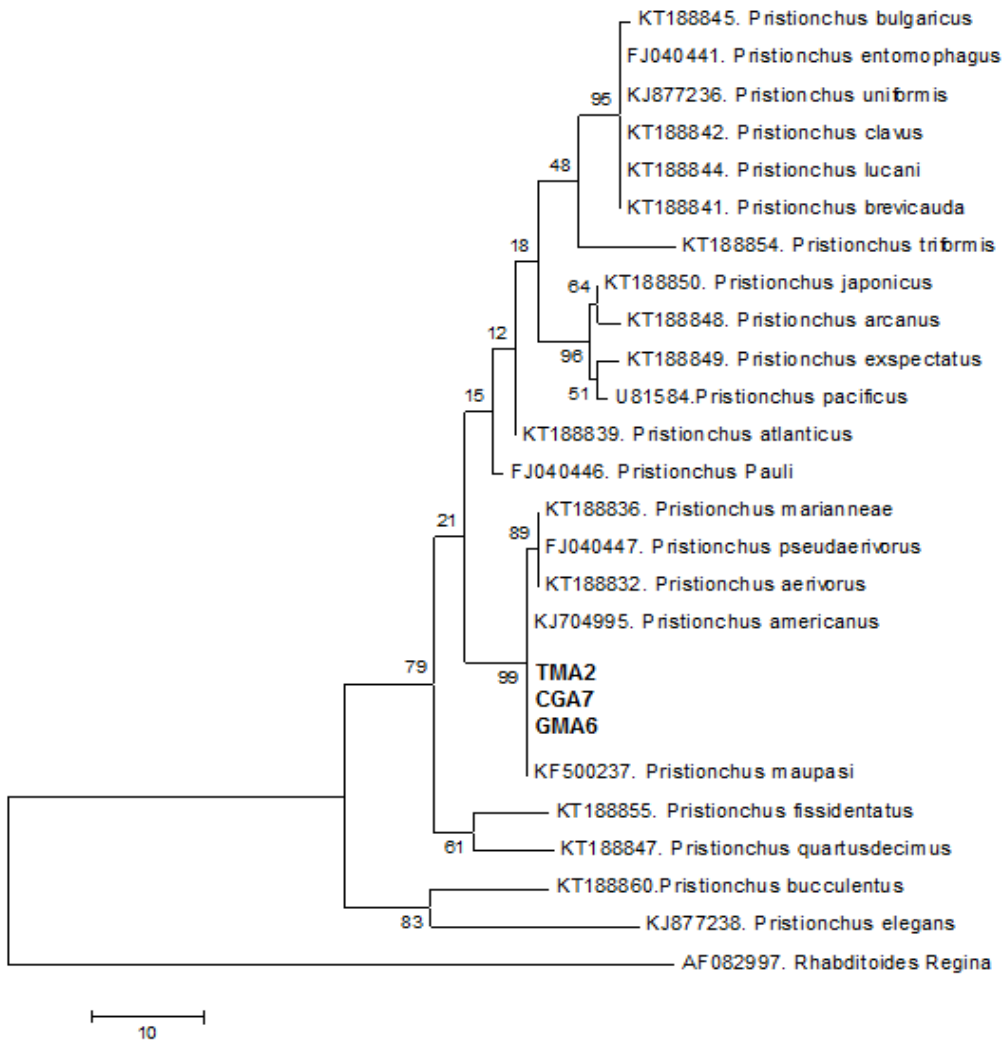
**Cuadro 7.** Información de las secuencias de mayor alineación del NCBI con las cepas de nematodos aisladas

Código de muestra	Primer	Región	No. Accesoión (ID)	Descripción del alineamiento	Identidad
TMA2	SSUF07	SSU/18S	KX382830	<i>Pristionchus americanus</i> 18S ribosomal RNA gene ID: KJ704995	99%
CGA7	SSUF07	SSU/18S	KX382831	<i>Pristionchus americanus</i> 18S ribosomal RNA gene ID: KJ704995	99%
GMA6	SSUF07	SSU/18S	KX382832	<i>Pristionchus americanus</i> 18S ribosomal RNA gene ID: KJ704995	99%
MMO9	SSU18A	SSU/18S	KX364289	<i>Diplogasteroides magnus</i> RS1983 18S RNA gene ID: JQ005869	99%
AS116	391	LSU/28S	KX364288	<i>Rhabditoides regina</i> DF5012 28S RNA gene ID: EF990726	100%

Para confirmar los alineamientos, se construyeron los cladogramas de cada una de las cepas, en los cuales se incluyen las secuencias de los especímenes de las poblaciones de nemátodos aislados y las secuencias del mismo género pertenecientes a la misma región del gen amplificado, incluyendo las secuencias de mayor alineación de nucleótidos del Genbank incluidas en el cuadro 7.

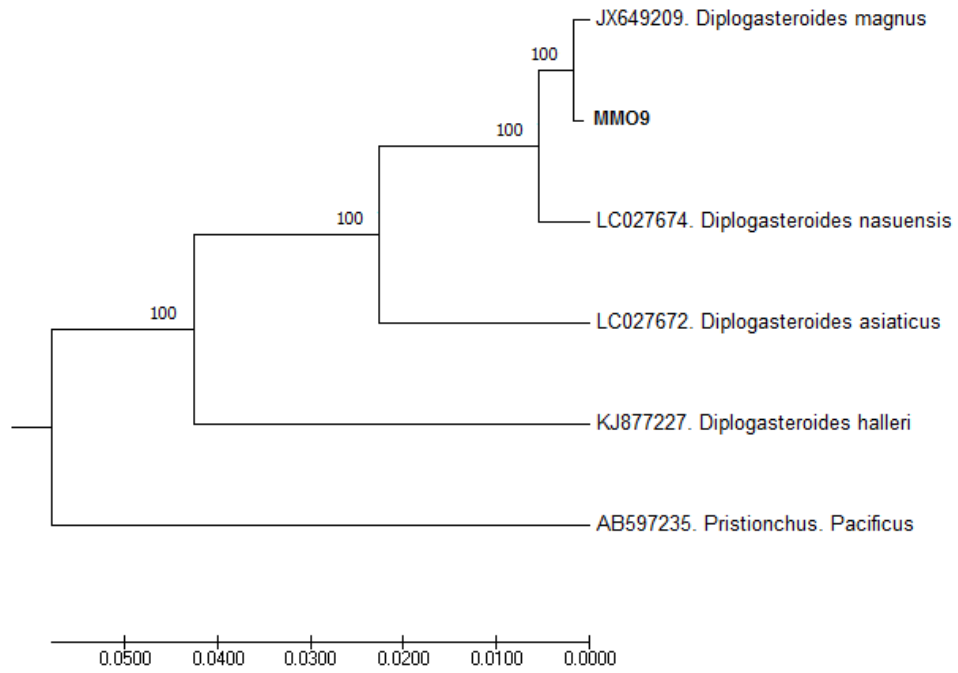
Para el caso de las cepas TMA2, CGA7 y GMA6, el árbol está basado en la región 18S ARNr, se puede observar que las cepas se agrupan entre las secuencias ID KJ704995 *Pristionchus americanus* e ID KF500237 *Pristionchus maupasi* (Figura 20), pero mediante la determinación taxonómica se ubico como *Pristionchus americanus*.

El árbol filogenético del aislamiento MMO9 está basado en la región 18S ARNr, se observa una identidad del 100% con todas las especies expuestas, pero está agrupada con la secuencia con ID JX649209 *Diplogasteroides magnus* (Figura 21).

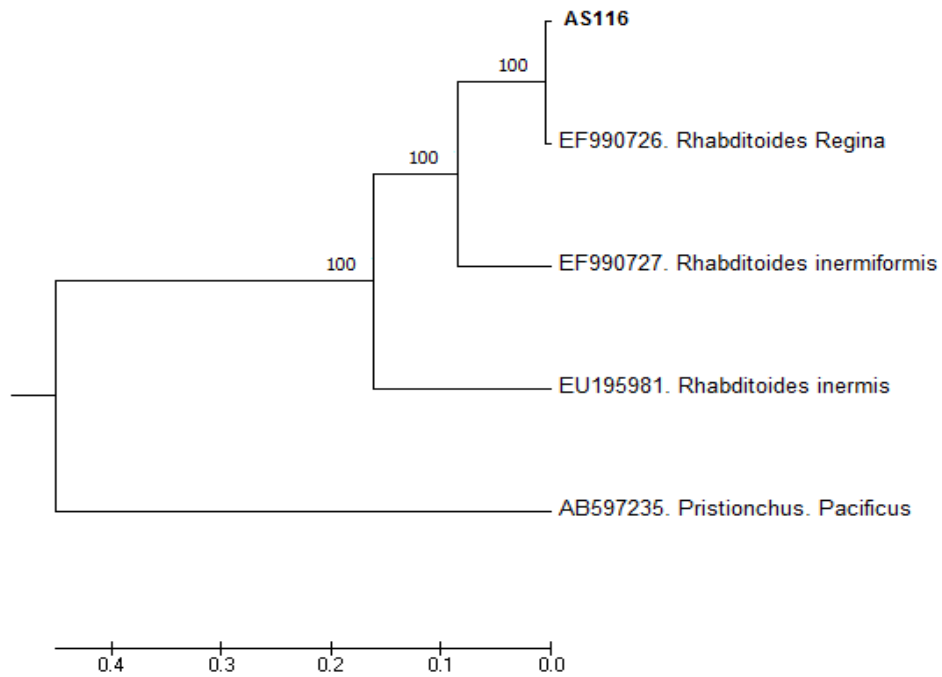


**Figura 20.** Árbol filogenético de las cepas TMA2, CGA7 y GMA6 obtenido del análisis de la región 18S. Los aislamientos obtenidos en este estudio se muestran en negritas.

El árbol filogenético del aislamiento AS116 está basado en la región 28S ADNr, se aprecia un 100% de identidad con las especies, pero se agrupa en el clado con la secuencia ID EF990726 *Rhabditoides regina* (Figura 22).



**Figura 21.** Árbol filogenético de la cepa MMO9 obtenido del análisis de la región 18S.



**Figura 22.** Árbol filogenético de la cepa AS116 obtenido del análisis de la región 28S.

## 6.4. Diagnósis

Las cepas TMA2, CGA7 y GMA6 mostraron alta similitud morfométrica entre ellas, no se presentaron variaciones en el tamaño y forma de las espículas, así como en la forma del gubernáculo, la presencia y disposición de papilas genitales por lo que se consideró que pertenecen a la misma especie. Además, las secuencias se agruparon dentro del mismo clado por lo que las cepas fueron identificadas como *Pristionchus americanus* Herrmann, 2006. Esta especie se distingue de las otras pertenecientes al género principalmente por la disposición de las papilas genitales y la longitud de los machos.

De acuerdo a las características morfológicas como la forma del gubernáculo y su orientación hacia las espículas mostrándose ventralmente abierto, así como las características morfométricas y moleculares, la cepa MMO9 fue identificada como *Diplogasteroides magnus* Volk, 1950, ésta puede ser distinguida principalmente porque dentro del género el adulto presenta un estoma más corto y el lado dorsal del estegostoma presenta un diente grande.

La cepa AS116 presentó la misma morfología que *Rhabditoides regina* Schulte y Poinar, 1991, ya que los machos presentan el grado de fusión de las espículas, reducción del velum y disposición de papilas genitales, las hembras muestran el extremo posterior en forma de cúpula y el comportamiento de los juveniles J3 es similar. Además, la cepa tuvo un 100% de identidad con la misma y se agrupó dentro del mismo clado, por lo cual se estableció como la misma especie.

## 6.5. Pruebas de patogenicidad *in vitro* de los aislamientos de nematodos sobre insectos descortezadores

Todas las cepas de nematodos entomopatógenos evaluadas, se observó que son capaces de buscar y causar mortalidad a adultos de *Dendroctonus. frontalis* en comparación con el testigo.

En los ensayos de patogenicidad *in vitro* se registró un efecto significativo del tiempo, la especie de nematodo y de la interacción tiempo x especie de nematodo, sobre la mortalidad de escarabajos descortezadores *D. frontalis* (Cuadro 8).

**Cuadro 8.** Resultados del modelo lineal generalizado con distribución cuasibinomial que prueba el efecto del tiempo, especie de nematodo y su interacción (tiempo x especies de nematodo) sobre la mortalidad de *Dendroctonus frontalis*

EFEECTO	g.l.	DEVIANZA	P
Tiempo	1	1.75	< 0.001
Especie de nematodo	5	10.62	< 0.001
Tiempo x Especie de nematodo	5	0.55	< 0.001

La comparación de promedios mediante la prueba de Tukey mostró diferencias significativas sobre la mortalidad de *D. frontalis* entre las distintas especies de nematodos (Figura 23), excepto la especie *Pristionchus americanus* GMA6 y CGA7 que presentaron similitud entre sí (Figura 5). La especie de nematodo que presentó mayor porcentaje de mortalidad fue *Rhabditoides regina* (AS116) con 98%, seguida de *Pristionchus americanus* (GMA6) con 95%, *P. americanus* (CGA7) con 92%, *P. americanus* (TMA2) con 87% y *Diplogasteroides magnus* (MMO9) con 33%. El Control presentó un 17% de mortalidad natural.

El análisis estadístico además indicó un efecto significativo entre la especie del nematodo y su interacción con el tiempo sobre la mortalidad de *D. frontalis* (Cuadro 8), con lo cual se puede observar en la Figura 24 que las especies *D. magnus* (MMO9), *P. americanus* (TMA2) y *P. americanus* (GMA6) presentan diferencias significativas sobre la mortalidad a las 48 y 96 h, en cambio las especies *R. regina* (AS116) y *P. americanus* (CGA7) presentan similitud en ambas horas.

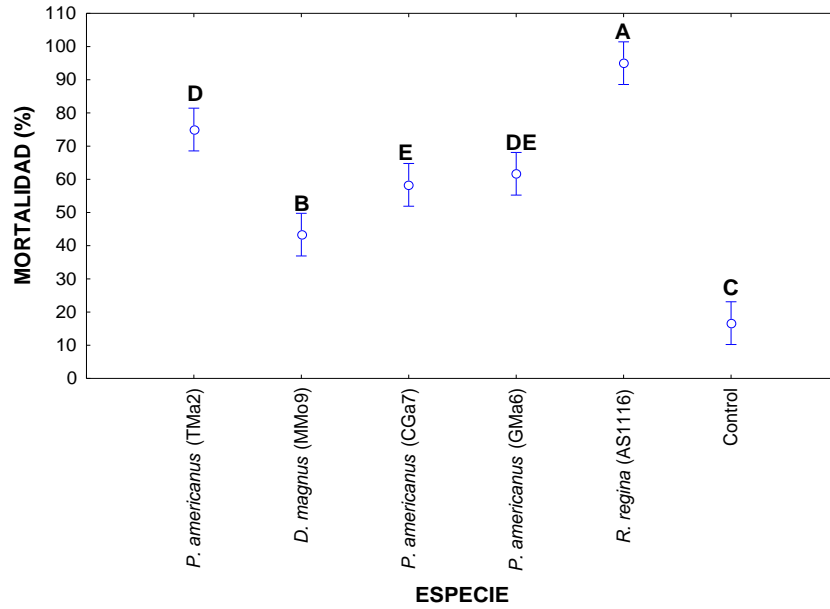


Figura 23. Efecto de las especies de nematodos sobre la mortalidad de *D. frontalis*. Letras diferentes denotan diferencias significativas  $P$  (0.001).

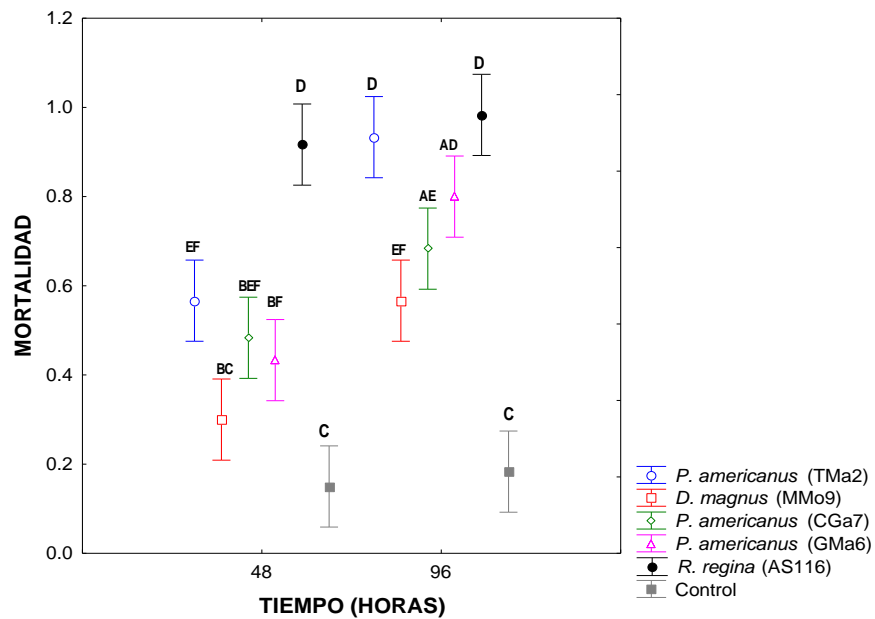


Figura 24. Efecto de las diferentes especies de nematodos sobre la mortalidad de *D. frontalis* respecto al tiempo. En donde se comparten letras iguales no hay diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ( $P < 0.001$ ).



## 6.6. Reproducción de nematodos *in vitro*

Los tres tratamientos evaluados permitieron la reproducción de *Pristionchus americanus* (cepa TMA2, CGA7, GMA6), *Rhabditoides regina* (cepa AS116) y *Diplogasteroides magnus* (cepa MMO9). Se evidenciaron las diferencias significativas entre cada uno de los tratamientos, el tratamiento 1 (agar-agar 1%+ alimento para perro marca Cesar®), obtuvo un promedio de 5139 nematodos/ml, el tratamiento 2 (agar-agar 1%+ Paté de hígado de cerdo Zwan®) 4770 nematodos/ml y el tratamiento 3 (*G. mellonella*) 2590 nematodos/ml.

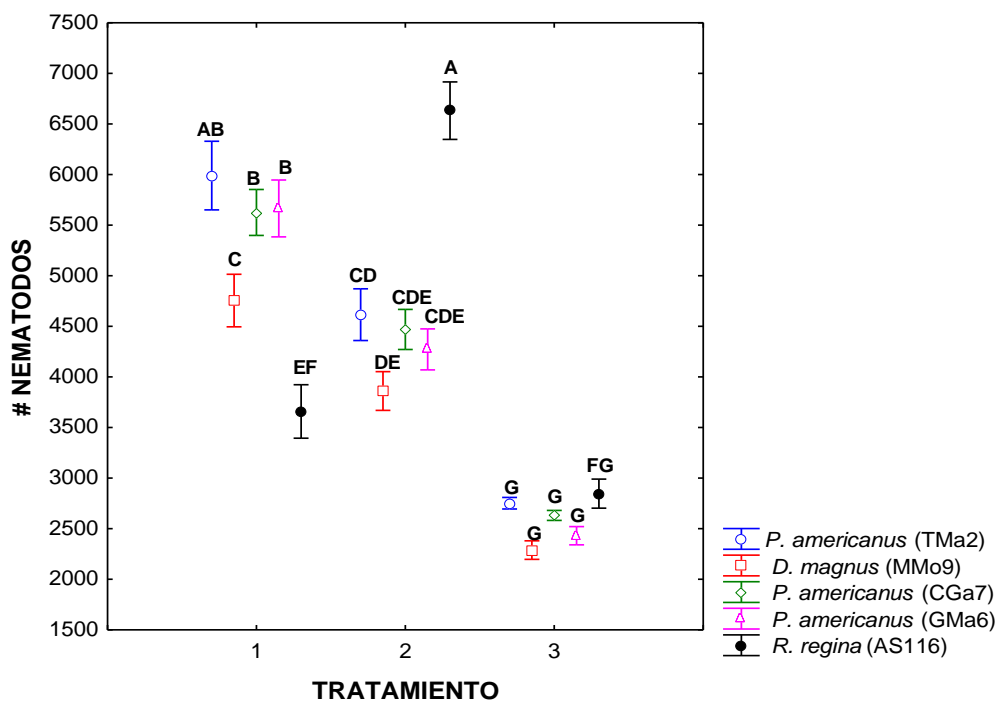
En los tratamientos *in vitro* se registró un efecto significativo del medio, especie, tiempo y las interacciones medio x especie de nematodo, medio x tiempo, especie x tiempo y medio x especie x tiempo sobre la reproducción de nematodos (cuadro 9).

**Cuadro 9.** Resultados del modelo lineal generalizado con distribución Poisson que prueba el efecto del medio, medio, especie, tiempo y las interacciones medio x especie de nematodo, medio x tiempo, especie x tiempo y medio x especie x tiempo sobre la reproducción de nematodos

<b>EFEECTO</b>	<b>g.l.</b>	<b>DEVIANZA</b>	<b>P</b>
<b>Tratamiento</b>	2	49246.48	<0.001
<b>Especie</b>	4	3078.4	<0.001
<b>TIEMPO (DIAS)</b>	1	4324.1	<0.001
<b>TratamientoxEspecie</b>	8	14196.32	<0.001
<b>Tratamiento xTIEMPO (DIAS)</b>	2	695.09	<0.001
<b>EspecieXTIEMPO (DIAS)</b>	4	275.33	<0.001
<b>Tratamiento xEspecieXTIEMPO (DIAS)</b>	8	172.53	<0.001

El análisis estadístico indicó que hay un efecto significativo entre la especie de nematodo y el tratamiento (Cuadro 9) sobre el número de nematodos. Se puede observar de manera general en la Figura 25 que el tratamiento 1 tiene mayor promedio de nematodos respecto al tratamiento 2 y 3; en el tratamiento 1 las cepas TMA2, CGA7 Y GMA6 presentan similitud, con un número promedio de 5990, 5626 y 5665 nematodos/ml respectivamente. Por el contrario, los aislados AS116 y MMO9 presentan diferencias significativas con un promedio de 3658 y 4755 de nematodos/ml respectivamente. En el tratamiento 2 las especies muestran similitud excepto la población AS116 con un promedio de 6632 nematodos/ml. Finalmente, para el tratamiento 3 ninguna de las especies muestra diferencias significativas.

Se presentó un efecto significativo del tratamiento y su interacción especie x tiempo sobre el número de nematodos (cuadro 9). De acuerdo con la prueba de Tukey, el tratamiento 1 presento diferencias significativas ( $P < 0.001$ ) en el tiempo transcurrido a partir de la inoculación de los nematodos únicamente en la especie *P. americanus* (cepa TMA2) con un aumento promedio de 5 000 a 7 000 nematodos en tres días. En el caso del tratamiento 2 y 3 no se observan diferencias significativas en cuento al tiempo (Figura 26).



**Figura 25.** Efecto de la especie de nematodo sobre el número de nematodos de cada tratamiento. Donde se comparten letras iguales no hay diferencias significativas ( $P < 0.001$ ).

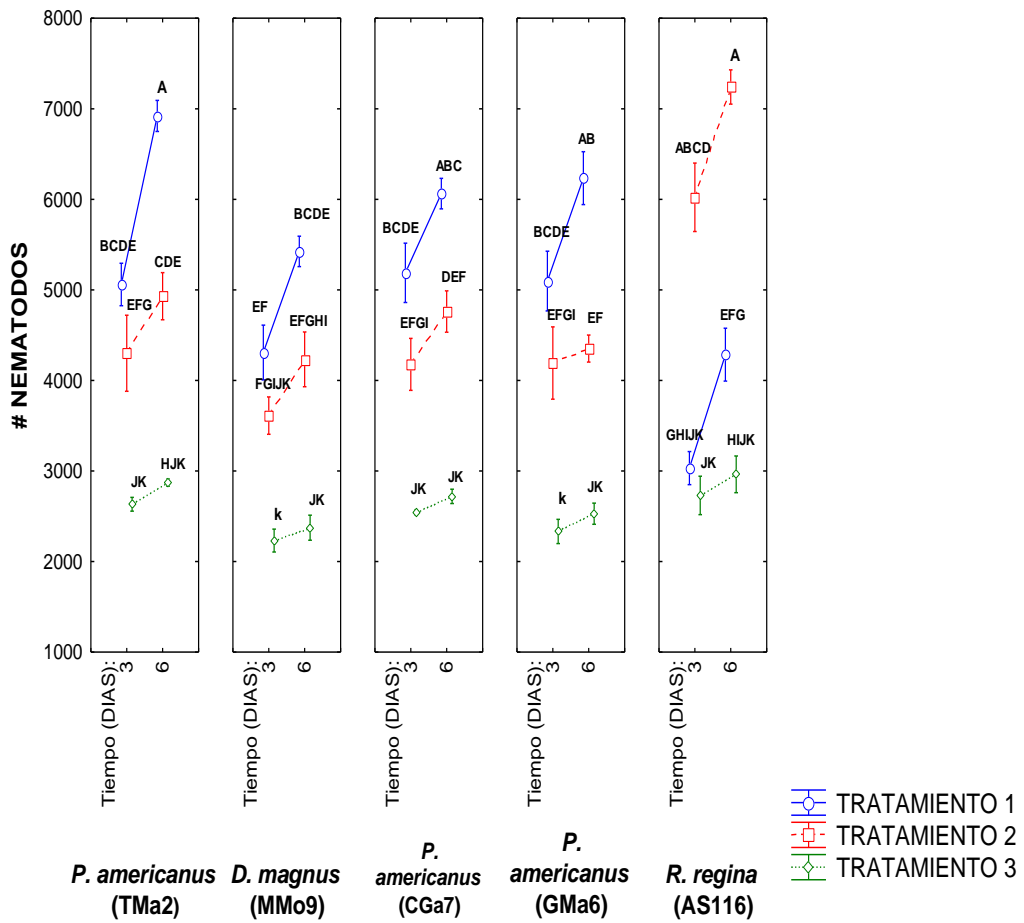


Figura 26. Efecto del tratamiento en el número de nematodos en relación al tiempo y a la especie. Letras diferentes denota diferencias significativas ( $P < 0.001$ ).

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1. Aislamiento de nematodos entomopatógenos

La tasa de recuperación de nematodos fue del 17% y 22% para los estados de Aguascalientes y Querétaro, respectivamente. Estos valores fueron mayores a los obtenidos por Grifaldo- Alcántara (2011) en Veracruz, donde colectó un total de 18 muestras de suelo y obtuvo tres aislados del nematodo entomopatógeno *Steinernema riobravis*. En Chile, Edgington *et al.* (2010) obtuvo una tasa de recuperación del 7%, Uribe *et al.* (2005) en en Costa Rica el 12%, Dolinski *et al.* (2008) en Brasil el 12.1%, pero la recuperación fue más baja en comparación con Stock *et al.* (1999) en California con una tasa del 26.3%, y Girón *et al.* (2012) en los valles centrales de Oaxaca con 49.1%, México. Sin embargo, los métodos e intensidad de muestreo y los insectos cebo que se utilizaron difieren. Además, la ocurrencia de nematodos varía en función de diferentes factores como la textura, la humedad, el carbono y pH presente en el tipo de sustrato donde se aloje el nematodo (Lacey y Kaya 2000).

Por otro lado, la presencia de estos nematodos en Querétaro y Aguascalientes confirma la distribución cosmopolita de dichos organismos, pues han sido aislados en suelos de una gran cantidad de países como Puerto Rico (Roman y Beauvers, 1983), Islas Hawaianas (Hara *et al.*, 1991), Egipto (Shamseldeam y Abdelgawad, 1994), Italia (Deseo *et al.*, 1988), Suecia (Burman *et al.*, 1986), Suiza (Steiner, 1996), Checoslovaquia (Mracek, 1980) y Gran Bretaña (Hominick y Briscoe, 1990).

### 7.2. Diagnósis

Hasta hace unas décadas, la descripción de los nematodos se fundamentaba principalmente en caracteres morfológicos y morfométricos. 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 utiliza una combinación de métodos que incluyen la morfología y análisis de perfiles de ADN (Hominick, 2002).

De acuerdo con los trabajos de de Andrásy (1984) y Herrmann *et al.* (2006a) las tres cepas TMA2, CGA7 y GMA6 se asemejan con la especie *Pristionchus americanus*, caracterizada por la posición de las papilas genitales y por las características morfométricas (Cuadro 4). La especie se aisló por primera vez en *Polyphylla fullo* (Coleoptera: Scarabaeidae) en Centerville, Massachusetts, Estados Unidos de América descrita por Herrmann *et al.* (2006a), este es el primer reporte de la especie en el Estado de Querétaro. En el análisis filogenético las cepas se agruparon con la especie *Pristionchus maupasi*, pero se descartó por las características morfológicas como la disposición de las papilas genitales, además la especie *P. maupasi* es un nematodo que presenta hermafroditas (Herrmann, 2006b) a diferencia de las cepas de este estudio que presentan sexos separados.

Hasta hace unas décadas, la descripción de los nematodos se fundamentaba principalmente en caracteres morfológicos y morfométricos. 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 utiliza una combinación de métodos que incluyen la morfología y análisis de perfiles de ADN (Hominick, 2002). Esto permitió confirmar la especie *Pristionchus americanus*

*Diplogasteroides magnus* fue descrita por primera vez por Volk 1950, en donde aisló juveniles infectivos de *D. magnus* en *Nicrophorus vespillo* (L.), y en adultos de *N. vespilloides* y *Geotrupes Stercorosus*. Autores como Kreft (2012) y Kiontke (2001) la asocian con fauna europea, como *Amphimallon cf. solstitiale* (L.), *Hoplia philanthus* Fuesslin, *Melolontha hippocastani* Fabricius, *M. melolontha* (L.), *Phyllopertha horticola* (L.) y *Anomala dubia*. Sin embargo, la cepa MMO9 presenta características como la forma conspicua del gubernáculo y su orientación hacia las espículas en los machos, además de presentar hermafroditismo, lo que confirma su identidad como *D. magnus*.

La cepa AS116 mostró alta similitud morfométrica y morfológica con la especie *Rhabditis (Rhabditoides) regina* descrita por Schulte y Poinar 1991, características como la reducción en el grado de fusión de la espícula y disposición de las papilas de la bursa en los machos; final de la cola en forma de cúpula en las hembras y el comportamiento de los juveniles infectivos (J3) permitieron identificarla en la misma especie. Esta especie se aisló por primera vez en Guatemala, aislada de la cavidad del cuerpo de larvas de escarabajo (Scarabaeidae: Coleoptera) (Schulte y Poinar, 1991). El nematodo *R. regina* fue reportado por primera vez para México por Jiménez *et al.* (2016) quien realizó el primer registro de

ocurrencia en *Phyllophaga sp.* y *Anomala sp.* en el país. La cepa AS116 resultó 100% homóloga con la secuencia ID EF990726 *Rhabditoides regina* para la región del genoma, lo que ratifica lo planteado por De ley *et al.* (2005) mencionando que trabajar con la región del ADNr LSU (Large SubUnit) en nematodos, proporciona sitios, por un lado, suficientemente conservados en todos los clados de nematodos, pero a la vez suficientemente divergentes para ser utilizados como herramienta de diagnóstico molecular.

### **7.3. Pruebas de patogenicidad *in vitro* de los aislamientos de nematodos sobre insectos descortezadores**

En el presente estudio se encontró variabilidad de respuesta en la patogenicidad de las diferentes especies de nematodos evaluadas sobre el escarabajo descortezador *Dendroctonus frontalis*. Se observó que las especies *Rhabditoides regina* (AS116), *Pristionchus americanus* (GMA6), *Pristionchus americanus* (CGA7), *Pristionchus americanus* (TMA2) causaron la mortalidad más alta del estado adulto de *D. frontalis* al tener respectivamente 98, 95, 92 y 87% con una dosis de 1000 juveniles/ml, asimismo que la especie *Diplogasteroides magnus* (MMO9) presentó una patogenicidad del 33%.

Con respecto a *Rhabditoides regina* (AS116) y *Pristionchus americanus* (GMA6, CGA7 y TMA2) el porcentaje de patogenicidad es bastante aceptable; los resultados permiten ser comparados con la utilización de otros medios de control biológico del descortezador como lo reportado por Gijón *et al.* (2015) en donde el aislamiento del hongo nativo *Trichoderma sp.* demostró una efectividad del 100% en la muerte de los insectos descortezadores. No hay mucha información respecto al control biológico de descortezadores con nematodos entomopatógenos, pero las cepas AS116, GMA6, CGA7 y TMA2 demostraron una efectividad igual o incluso mayor que la de algunos nematodos entomopatógenos como *Steinernema carpocapsae*, aislado de suelo de agave (*Agave angustifolia* Haw) en los valles centrales de Oaxaca, donde evaluaron su potencial para el control del picudo del agave, *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae) que mató el 95% de larvas de tercer estadio del gorgojo 120 horas después de la aplicación de 1000 juveniles infectivos. Delgado-Ochica (2012) encontró que *S. websteri* a dosis de 100 juveniles infectivos por larva mató a sólo el 25% de las larvas de cuarto instar de picudo de la guayaba *Conotrachelus psidii* Marshall. Los nematodos

entomopatógenos *Heterorhabditis bacteriophora* y *H. indica*, que se evaluaron como biopesticidas contra larvas de *Diaprepes abbreviatus* mostraron una efectividad del 71% a los siete días de exposición (McCoy, 2000).

La capacidad de la cepa *Rhabditoides regina* AS116 para causar la muerte del huésped se puede atribuir principalmente a su microbiota asociada (Dillman *et al.*, 2012). Jiménez (2016), Tambong (2013). y otros autores reportan que las bacterias asociadas con *R. regina* son *Alcaligenes*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Enterococcus*, y *Bacillus*, pero éstas pueden variar dependiendo la cepa; mantienen asociaciones transitorias nematodo- bacteria, que les llevan a sobrevivir en diferentes condiciones (Tambong 2013). Dichas bacterias han demostrado efectividad patogénica contra insectos como el caso de *Serratia marcescens*, *S. nematodiphila*, y *Pseudomonas fluorescens*, que se han recuperado de la hemolinfa de insectos infectados con nematodos entomopatógenos. *Serratia marcescens* demostró una actividad altamente insecticida cuando fue expuesta a gusanos cortadores (Nishiwaki *et al.*, 2007). *Serratia nematodiphila* se ha encontrado asociada con el nematodo entomopatógeno *Heterorhabditoides chongmingensis* (Rhabditida: Rhabditidae) y fue altamente virulenta en larvas de *G. mellonella* (Zhang *et al.*, 2008). *Pseudomonas fluorescens* produce cianuro de hidrógeno y puede causar mortalidad de los insectos mediante la inhibición de citocromo C oxidasa en la cadena respiratoria de la termita *Odontotermes obesus* (Devi y Kothamsi 2009).

*R. regina* podría tener un estilo de vida complejo, fluctuando entre la vida libre (alimentándose de bacterias del suelo), necromenic (adquisición de bacterias de insectos muertos) o tener propiedades de nematodo entomopatógeno (infectando activamente hospederos) que se explica principalmente por asociación con *Klebsiella sp.* y *Serratia sp.* (Li *et al.*, 2015).

Las cepas *Pristionchus americanus* (GMA6, CGA7 y TMA2) pertenecen a un grupo de nematodos que presentan una interacción con otros organismos conocida como necromenic, que les ha permitido vivir en estrecha asociación con los escarabajos (Ragsdale *et al.*, 2015), por ejemplo, *P. pacificus* ha sido asociado a los escarabajos *Leptinotarsa decemlineata* y *Exomala orientalis*. *Pristionchus maupasi* en Europa y *P. entomophagus* en America del Norte son predominantes en abejorros y en escarabajos del estiércol *Geotrupes spp.* (Mayer *et al.*, 2007), *P. americanus* también se ha detectado en *Polyphylla fullo* (Herrmann, 2006a). D'Anna (2011) aisló *P. aerivorus* y *P. pseudaaerivorus* de *Phyllophaga* en Europa.

En esta asociación los nematodos no se alimentan activamente, sino que invaden al huésped y permanecen detenidos en etapa dauer hasta la muerte del huésped y es cuando se reanuda su desarrollo dentro del cadáver, es decir utilizan al huésped como refugio, medio de transporte y se alimentan de los hongos, bacterias y otros nematodos que crecen en el cuerpo después de que el huésped ha muerto (Dieterich *et al.*, 2008). Se ha comprobado que algunas especies de *Heterorhabditis*, que se clasifican como nematodos entomopatógenos, pueden comportarse como necromenic bajo ciertas circunstancias (San-Blas *et al.*, 2008).

Aunque se considera a la mayoría de las especies de *Pristionchus* como necromenic asociadas a insectos algunos son sospechosos de ser agentes patógenos o parásitos débiles de su insecto huésped, como es el caso de *P. aerivorus* que puede causar infecciones letales de insectos (Chitwood, 1937). Los resultados de este estudio son prueba de ello.

Durante un estudio de nematodos entomopatógenos en Carolina del Norte, Estados Unidos, se recuperó la especie *P. aerivorus* de larvas de *Galleria mellonella*, que murieron dentro de las primeras 48 horas, y donde se recuperó un alto número de nematodos cinco días más tarde; se planteó que esta especie podría estar asociada a bacterias entomopatógenas, pero no se demostró si efectivamente estas bacterias son llevadas en el intestino y vaciadas en el interior del insecto por los nematodos juveniles infectivos. Se ha demostrado que especies pertenecientes al género *Pristionchus* presentan asociaciones con bacterias entomopatógenas, como *P. entomophagus* recogido de Alemania de donde se aisló *Proteus vulgaris*, una bacteria que es patógena en los insectos (Rae *et al.*, 2008). Las pruebas preliminares revelaron que este nematodo es capaz de infectar al menos otras dos especies de insectos (*Helicoverpa zea* y *Tenebrio molitor*) con un 100% de mortalidad (Ye, 2015).

El alto porcentaje de patogenicidad de los nematodos de las cepas *Pristionchus americanus* TMA2, CGA7 y GMA6 evaluados en este estudio sobre *D. frontalis* revelan que son capaces de infectar a este insecto y que podrían estar asociadas a bacterias entomopatógenas, lo cual requiere estudios adicionales para determinar a las bacterias asociadas de estos nematodos.

La cepa *Diplogasteroides magnus* (MMO9), con un porcentaje de mortalidad de 33%, se consideró bajo comparado con las otras cepas de este trabajo; debido a que las



condiciones y la dosis (1000 juveniles/ml) fueron las mismas, los resultados pueden atribuirse a que esta cepa se aisló directamente del insecto descortezador *Ips lecontei* con lo que se puede inferir una asociación más directa con este escarabajo, al respecto Kiontke (2001) menciona que *D. magnus* se asocia principalmente con los escarabajos y que la mayoría de las especies del género viven en galerías larvales de madera que habitan escarabajos (Cerambycidae y Curculionidae).

Al-own (2013) reporta la bacteria *Serratia proteamaculans* asociada a la hemolinfa de insectos infestados con *D. magnus*, bacteria perteneciente a un género con propiedades entomopatógenas (Li *et al.*, 2015), por lo que es probable que una bacteria haya ocasionado la mortalidad de los insectos de *D. frontalis*.

Los resultados obtenidos en este estudio revelan un porcentaje de mortalidad alto en adultos de *D. frontalis* causado por las diferentes especies de nematodos. Estos resultados difieren en general con los resultados que exponen otros autores como Reyes (2003), Vázquez (2012), Ye (2015), Delgado-Gamboa (2015) quienes encontraron la mayor patogenicidad de los nematodos entomopatógenos en estado de larva o pupa. Sin embargo, los nematodos de este estudio morfológicamente presentan un diente o dentículos en el metastoma dorsal, que es similar al que se presenta en *Heterorhabditis* y que presenta una gran ventaja morfológica, ya que este diente le permite romper la cutícula del insecto hospedero, facilitando su entrada directa al hemocele (Alatorre, 2010). Además, los nematodos entomopatógenos penetran usualmente al hospedero a través de las aberturas naturales del cuerpo como la boca y el ano (Glazer y Salame, 2000), espiráculos (Triggiani y Poinar, 1976) o directamente a través de las partes suaves del integumento (Koppenhofer *et al.*, 2000).

#### **7.4. Reproducción de nematodos *in vitro***

Los tres tratamientos permitieron la reproducción de las cinco cepas de nematodos aislados en este estudio. Las variaciones en el número de nematodos/ml obtenidos, mayor en el tratamiento 1 (5139/ml) que en el tratamiento 2 y 3 (4770 y 2590 respectivamente) se puede atribuir a los nutrientes que componían cada uno de los tratamientos.

El contenido lipídico del tratamiento 1 (agar-agar 1%+ alimento para perro marca Cesar®) 3.5% por cada 3 g, superior al paté que presenta 1.35% por cada 3 g y de *Galleria*

*mellonella* con 1.3% por cada larva (Melo, s.f.), en este sentido Yoo *et al.* (2000) enfatizaron la importancia de los lípidos ricos en ácidos grasos monoinsaturados para la elaboración de un medio de cultivo para nematodos. Los lípidos permiten la formación de la cutícula y son necesarios para completar el ciclo de vida de los nematodos (Ehlers, 1997). Hatab y Gaugler (1997) plantearon además que los lípidos metabolizados por los nematodos le proporcionan el 60% del total de su energía, de manera que su presencia es primordial en los medios de cultivo que se elaboren artificialmente para su reproducción. La composición de los medios tiene un efecto substancial sobre la producción de los nematodos: cuando se incrementa la cantidad y la calidad de lípidos aumenta la producción y calidad de los nematodos (Ehlers, 1997).

Se observó que en el medio que contenían a los nematodos hubo crecimiento bacteriano, esto representa la gran relación que existe entre los nematodos y sus simbioses, estas son las responsables de transformar el sustrato y convertirlo en una fuente factible para su alimentación (Forst y Clarke, 2002). Estos nematodos pueden además alimentarse de la biomasa bacteriana, y esto garantiza que las nuevas generaciones también presenten la bacteria simbiote alojada en su intestino, lista para ser liberada en el interior de otro insecto hospedero (Boemare, 2002).

El promedio de producción de nematodos para el tratamiento 1 y 2 fue de 102 782 nematodos/20 ml, 95 401 nematodos/20 ml respectivamente, sin embargo, Ortiz *et al.* (2012) afirman que estas producciones son muy variables, aunque si se comparan con otros estudios, la producción lograda en esta investigación es menor, ya que se han registrado promedios de producciones de diferentes especies como Somwong (2012) que reporta la reproducción del nematodo *Steinernema carpocapsae* en cuatro medios diferentes (artificiales e *in vivo*), en donde establece 3.038, 2.445, 2.989 y  $5.547 \times 10^5$  juveniles infecciosos / gramo de medio, sin embargo, la adición de ingredientes y suplementos a los medios es lo que permite atribuir el elevado número de nematodos.

Para el caso del tratamiento 3 *in vivo* se contabilizaron 51 802 nematodos/larva en seis días, superior a lo reportado por Realpe *et al.* (2007) donde la producción *in vivo* de juveniles infectivos de los nematodos utilizando la trampa White fue de 5750 juveniles infectivos/larva para *S. colombiense* y 5250 JI/larva para *H. bacteriophora* durante seis días.

La producción se puede ver afectada por el tamaño, la edad y la susceptibilidad del insecto (en caso de ser reproducción *in vivo*), las condiciones ambientales y de infección

como inóculo, la densidad de cadáveres de *G. mellonella* por unidad de área (en la reproducción *in vivo*), la temperatura, el tiempo de emergencia y la duración del ciclo en el hospedante y por supuesto de la especie de nematodo, la aireación y la humedad (Somwong, 2012).

Descriptivamente la producción de los nematodos también varió de acuerdo en la especie de nematodo, ya que a pesar de que el tratamiento 1 presentó mayor promedio de nematodos/ml, la cepa *Rhabditoides regina* cepa AS116 tuvo mejores resultados con el tratamiento 2 (véase Figura 23). Por lo anterior Gaugler y Han (2002) plantean que el establecimiento de los parámetros depende de la especie de nematodo por reproducir ya que la capacidad reproductiva y condiciones necesarias varían entre especies

## 8. CONCLUSIONES

Se aislaron cinco poblaciones de nematodos entomopatógenos en la Sierra Gorda de Querétaro y la Sierra Fría de Aguascalientes.

Las cepas de nematodos se identificaron taxonómica y molecularmente como *Pristionchus americanus* (cepas TMA2, CGA7, GMA6), *Diplogasteroides magnus* (cepa MMO9) y *Rhabditoides regina* (cepa AS116).

Los nematodos *Pristionchus americanus* cepa GMA6 y *Rhabditoides Regina* cepa AS116 son nematodos entomopatógenos con potencial para el control biológico de descortezadores.

Los tres tratamientos utilizados permitieron la reproducción de las especies de nematodos aislados. La mayor producción de nematodos se obtuvo del medio con alimento para perro Cesar®.

## 9. LITERATURA CITADA

- Akhurst, R. A. 1982.** Antibiotic activity of *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes of the families Heterorhabditidae and Steinernematidae. *Journal of General Microbiology*, 128: 3061-3066.
- Al-Own, F. 2013.** Population structure of insect pathogenic bacteria in UK soil and their associated nematodes. Tesis doctoral Department of Biology and Biochemistry. University of Bath.
- Alvarado, O. 2012.** Hábitos parasitarios y comportamiento de un aislamiento nativo del nemátodo entomopatógeno *Steinernema* sp. En larvas de *Galleria mellonella* L. Tesis de maestría. Facultad de ciencias agronómicas, Santiago de Chile.
- Andrássy, I., 1984.** *Klase Nematoda. Ordnungen Monhysterida, Desmoscolecida, Araeolaimida, Chromadorida, Rhabditida.* Stuttgart, Gustav Fischer, p. 509.
- Arredondo-Bernal, H. C., J. Molina-Ochoa & V. Hernández-Velázquez. 1999.** Potencial de nematodos entomopatógenos en control de plagas, ISBN 968-6190-99-6.
- Arrieta, A. R., & H. T. Atkinson. 1992.** Anatomía externa de larvas de escarabajos descortezadores (Coleóptera: Scolytidae) y su utilidad en la taxonomía. *Agrociencia. Serie Protección vegetal*, Vol. 3(3): 47-59.
- Atkinson, H. T., C. E. Saucedo, F. E. Martínez & Burgos S. A. 1986.** Coleópteros Scolytidae y Platypodidae asociados con las comunidades vegetales de clima templado y frío en el estado de Morelos, México. *Acta Zool. Mex*, 17: 31-33.
- Bathon, H. 1996.** Impact of entomopathogenic nematodes on non- target host. *Biocontrol Science and Technology*, 6: 421- 434.
- Batta, Y. A. 2007.** Biocontrol of almond bark beetle (*Scolytus amygdali* Geurin-Meneville, Coleoptera: Scolytidae) using *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Journal of applied microbiology*, 103(5): 1406–14.
- Bedding, R. 1990.** Logistic and strategies for introducing entomopathogenic nematode technology into developing countries. *Entomopathogenic nematodes in biological control.* (Ed.: R. Gaugles & H.K. Kaya) CRC Press, Boca Raton, 233-246.
- Bedding, R. A. & R. J. Akhurst. 1975.** A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditids nematodes in soil. *Nematologica*, 21:109-110.
- Billings, R. F., J. E. Flores L. & R. S. Cameron. 1996.** Los escarabajos descortezadores del pino, con énfasis en *Dendroctonus frontalis*: Guía para la detección aérea. Texas Forest Service Publication 149. p.19.
- Boemare, N. E. 2002.** Biology, Taxonomy and Systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*, *Entomopathogenic Nematology*, CABI Publishing, 35-56.
- Boemare, N. E., M. H. Boyer-Giglio, J. O. Thaler, R. J. Akhurst & M. Brehélin. 1993.** Lysogeny and bacteriocinogenic in *Xenorhabdus* spp., bacteria associated with entomopathogenic nematodes. *Appl. Environ. Microbiol*, 58: 3032-3037.
- Boemare, N.E., C. Laumond & H. Mauleon. 1996.** The entomopathogenic nematode bacterium complex: biology, life cycle and vertebrate safety. *Biocontrol Science and Technology*, 6: 33 -34.
- Boff, M. I., G. L. Wieers & P. H. Smits. 2000.** Effect of storage time and temperature on infectivity, reproduction and development of *Heterorhabditis megidis* in *Galleria mellonella*. *Nematology*, 2 (6): 635-644.
- Borror, J. D., A. C. Triplehorn & F. N. Johnson. 1989.** An introduction to the study of insects. Sixth edition.
- Bouchard, P., Y. Bousquet, A.E. Davies, M.A. Alonso-Zarazaga, J.F. Lawrence, C.H.C. Lyal, A.F. Newton, C.A.M. Reid, M. Schmitt, S.A. Ślipiński & A.B.T. Smith. 2011.**

- Family-group names in Coleoptera (Insecta). *Zookeys*, 88:1-972. doi:10.3897/zookeys.88.807.
- Burman, M., K. Abrahamsson, J. Ascard, A. Sjöberg & B. Eriksson. 1986.** Distribution of insect-parasitic nematodes in Sweden. In: *Fundamental and applied Aspects of Invertebrate Pathology* (R. A. Samson, J. M. Vlcek & D. Peters, Eds), 312. Foundation of the 4th Int. Colloq. of Invertbr. Pathol., Wageningen, The Netherlands.
- Byers, J. A. 1989.** Chemical ecology of bark beetles. *Experientia*, 45: 271- 283.
- Camacho, P. A. 2012.** El género *Ips* (Coleóptera: Curculionidae: Scolytinae) en México. Tesis doctoral. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Edo. De México.
- Campbell, L.R & R. Gaugler. 1991.** Mechanisms for exsheathment of entomopathogenic nematodes. *Int. J. Parasitol*, 21: 219-224.
- Campos-Herrera, R., M. Escuer, S. Labrador & C. Gutiérrez. 2006.** Aislamiento, identificación y caracterización ecológica de nematodos entomopatógenos de la Rioja. *Zubia*, (1): 23-24.
- Cane, H. J., L. D. Wood & W. J. Fox. 1990.** Ancestral semiochemical attraction persists for adjoining populations of sibling *Ips* bark beetles (Coleoptera: Scolytidae). *Journal of Chemical Ecology*. 16(4): 993-1013.
- Cantú, S. I. & H. R. González. 2002.** Propiedades hidrológicas del dosel de los bosques de pinoencino en el noroeste de México. *Ciencia. UANL*. Vol. 5(1): 72-77.
- Capinera, J. L., S. L. Blue, S. L. & G. S. Wheeler. 1982.** Survival of earthworms exposed to *Neoplectana carpocapsae* nematodes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 39: 419-421.
- Cares, J. E. & S. P. Huang. 2006.** Nematode communities in soils under different land-use systems in Brazilian amazon and savanna vegetation. *Soil Biodiversity in Amazonian and other Brazilian Ecosystems*, CABI Publishing, London, 163–183.
- Cayuela, D. L. 2006.** Deforestación y fragmentación de bosques tropicales montanos en los altos de Chiapas. Efectos sobre la diversidad de los árboles. *Ecosistemas*. 15(3): 192-198.
- Cedillo, O. I. & E. Mares. 1994.** Geografía de Aguascalientes. Complemento didáctico. Comisión Estatal de Desarrollo Económico y Comercio Exterior y Gobierno del Estado de Aguascalientes. *El Heraldo de Aguascalientes*. Aguascalientes, 158 pp.
- Chaires-Grijalva, M. P., E. Estrada-Venegas, A. Equihua-Martínez, J. C. Moser & S. R. Blomquis. 2015.** Ácaros digamáselidos (acarí: mesostigmata: digamasellidae) asociados a descortezadores en México. *Entomología Mexicana*, 2: 100-105.
- Chitwood, B. G. 1937.** A revised classification of the Nematoda. *Papers in Helminthology*, 30 Year Jubileum K.J. Skryabin. R.-E. S. Schulz and M. P. Gnyedina. Moscow, All-Union Lenin Academy of Agricultural Sciences, pp. 67-80.
- Cibrián, D. J. M. Méndez, R. Campos, H.O. Yates & J. E. Flores. 1995a.** *Insectos Forestales de México/Forest Insects of Mexico*. Universidad Autónoma Chapingo, Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, United States Department of Agriculture, Natural Resources Canada y Comisión Forestal de América del Norte. 455 p.
- Cibrián T. D., J.T. Mendez, R. Campos, H.O. Yates III & J.E. Flores. 1995b.** **Las especies del género *Ips* encontradas en México.** *Insectos Forestales de México*. Universidad Autónoma de Chapingo/ Comisión Forestal de América del Norte, Publicación #6. 301-316.
- Cibrián T. D., J.T. Mendez, R. Campos, H.O. Yates III, J.E. Flores. 1995c.** **Tres especies del género *Dendroctonus* encontradas en México.** *Insectos Forestales de México*. Universidad Autónoma de Chapingo/ Comisión Forestal de América del Norte, Publicación 6, 269-285 pp.

- CONABIO. 1998.** La diversidad biológica de México: Estudio de País. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.
- CONABIO. 2008.** La diversidad biológica forestal en México. Recuperado en febrero 2015 de: [http://www.conabio.gob.mx/institucion/cooperacion\\_internacional/doctos/dbf\\_mexico.html](http://www.conabio.gob.mx/institucion/cooperacion_internacional/doctos/dbf_mexico.html).
- CONAFOR. 2015.** Alerta temprana para insectos descortezadores diciembre del 2015. Recuperado en marzo 2016 de: [www. Conafor.gob.mx](http://www.conafor.gob.mx).
- CONAFOR. 2013.** Estadísticas de Gerencia Estatal de Querétaro, Querétaro, México.
- Coulson, R. N. y J. A. Witter. 1990. Entomología Forestal. Ecología y Control. Ed. Limusapp.
- Coyne, D. L., M. Nicol & J. Claudius. 2007.** Practical plant nematology: a field and laboratory guide. SP-IPM Secretariat, International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Cotonou, Benin.
- D' Anna, I., & R. J. Sommer. 2011.** *Pristionchus uniformis*, Recent host range expansion in a European nematode. *Ecology and Evolution*. doi:10.1002/ece3.28.
- De Ley, P., D. L. Tandingan, K. Morris, E. Abebe, O. M. Mundo, M. Yoder, J. Heras, D. Waumann, O. A. Rocha, A. H. Jay Burr, J. G. Baldwin & T. Kelley. 2005.** An integrated approach to and informative morphological vouchering of nematodes for applications in molecular barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 360: 1945-1958.
- Durán, E. & A. Poloni. 2014.** Escarabajos descortezadores: diversidad y saneamiento en bosques de Oaxaca. *CONABIO. Biodiversitas*, 7-12.
- Delgado-Gamboa J. R., J. Ruíz-Vega, T. Aquino-Bolaño, S. Girón-Pablo. 2014.** Revisión de nematodos entomopatógenos aislados en México. *Entomología Mexicana*, 1: 284-288.
- Delgado-Gamboa, J. R., J. Ruíz-Vega, J. E Ibarra-Rendón, T. Aquino-Bolaños & S. Giron-Pablo. 2015.** Isolation and Identification of Native Entomopathogenic Nematodes (Nematoda: Rhabditidae) and Potential for Controlling *Scyphophorus acupunctatus* in a Laboratory. *Southwestern Entomologist*, 40(4):731-739.
- Delgado-Ochica, 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*, 17: 283-290.
- Deseo, K. V., P. Fantoni & G. L. Lazzari. 1988.** Presenza di nematodi entomopatogeni (*Steinernema* spp., *Heterorhabditis* spp.) nei terreni agricoli in Italia. *Atti Giornate Fitopathol*, 2: 269-280.
- Devi, K. K. & D. Kothamasi. 2009.** *Pseudomonas Fluorescens* CHA0 Can Kill Subterranean Termite *Odontotermes Obesus* by Inhibiting Cytochrome c Oxidase of the Termite Respiratory Chain. *FEMS Microbiology Letters*, 195-200.
- Díaz, N. V. 2005.** Uso de semioquímicos para el manejo y monitoreo de escarabajos descortezadores (*Dendroctonus* spp.) del pino, en la Sierra Fría, Aguascalientes. Tesis de Maestría. Centro de Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- Dieterich, C., S. W. Clifton, L. N. Schuster, A. Chinwalla, K. Delehaunty, I. Dinkelacker, L. Fulton, R. Fulton, J. Godfrey & P. Minx. 2008.** The *Pristionchus pacificus* genome provides a unique perspective on nematode lifestyle and parasitism. *Nature Genetics*, 40: 1193-1198.
- Dillman, A. R., J. M. Chaston, B. J. Adams, T. A. Ciche, H. Goodrich-Blair, S. P. Stock & P. W. Sternberg. 2012.** An entomopathogenic nematode by anyother name. *PLoS Pathog* 8: e1002527.
- Dolinski, C., F. L. Kamitani, I. R. Machado & 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.
- Domínguez, S. B., S. E. Macías, M. N. Ramírez & C. L. León. 2008.** Respuesta kairomonal de coleópteros asociados a *Dendroctonus frontalis* y dos especies de *Ips* (Coleóptera: Curculionidae) en bosques de Chiapas, México. Revista mexicana de biodiversidad, 79: 175-183.
- Edgington, S., A. G. Buddie, D. Moore, A. France, L. L. Merino, L. M. Tymo, & D. J. Hunt. 2010.** Diversity and distribution of entomopathogenic nematodes in Chile. Nematology, (12): 915-928.
- Ehlers, S. & S. Stoessel. 1997.** The influence of phase variants on *Xenorhabdus* spp. and *E.coli* on the propagation of entomopathogenic nematode of the genera *Steirnenema* and *heterorhabditis*. Science technology, Vol. 13(6): 417-424.
- Ehlers, R. U. 2001.** Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. Appl. Microbiol. Biotechnol, 56: 523-633.
- Emelianoff V., N. Le Brun, S. Pagès, S.P. Stock, P. Tailliez, C. Mouliá & M. Sicard. 2008.** Isolation and identification of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria from Hérault and Gard (Southern France) *Journal of Invertebrate Pathology*, 98 (2): 211-217.
- Equihua, M. A. & S. A. Burgos. 2002.** Scolytidae. Biodiversidad, Taxonomía y biogeografía de artrópodos de México: Hacia una síntesis de su conocimiento. Vol. III. UNAM, México, D. F. 690 p.
- Fan, X., A. Maggiorani & S. Gudiño. 2000.** Uso de entomopatógenos como una alternativa en el control de polilla (*Tecia solanivora*), importante plaga de la papa (*Solanum tuberosum*). Mérida-Venezuela. Rev. Forest. Venez, 44(1): 115-118.
- Faria, M. R. & S. P. Wraight. 2007.** Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. Biological Control, 43: 237-256.
- Ferris, H. 2008.** The nematode-plant expert information system. A Virtual Encyclopedia on Soil and Plant Nematodes. Comparison of Morphology- and DNA-based Classifications. Department of Nematology, University of California.
- Fettig, C. J., T. DeGomez, K. E. Gibson, C. P. Dabney, & R. R. Borys. 2006.** Effectiveness of permethrin plus-C and carbaryl for protecting individual, high-value pines from bark beetle attack. Arboriculture and Urban Forestry, 32:247-252.
- Fettig, J. C., D. K. Klepzig, F. R. Billings, A. S. Munson, T. E. Nebeker, F. J. Negrón & T. J. Nowak. 2007.** The effectiveness of vegetation management practices for prevention and control of bark beetle infestations in coniferous forests of the western and southern United States. Forest Ecology and Management, 238: 24-53.
- Floyd, R., Abebe, E., Papert, A. & Blaxter, M. 2002.** Molecular barcodes for soil nematode identification. *Molecular Ecology*, 11: 839-850.
- Fonseca, G. J., P. H. De los Santos, C. C Llanderal, T. D. Cibrián, T. D. Rodríguez & H. J. Vargas. 2008.** *Ips* e insectos barrenadores en árboles de *Pinus montezumae* dañados por incendios. Madera y Bosques. Primavera, 14(1): 69-80.
- Fonseca, G. J., C. C. Llanderal, T. D. Cibrián, M. A. Equihua, M. A & P. H. De los Santos. 2009.** Secuencia de arribo de coleópteros en árboles de *Pinus montezumae* Lamb. dañados por incendios. Rev. Ciencia Forestal en México, 34(106): 149-170.
- Forst, S. & D. Clarke. 2002.** Bacteria-Nematode Symbiosis, *Entomopathogenic Nematology*, New York CABI Publishing, pp. 57-77.
- Freckman, D.W., & J. G. Baldwin. 1990.** Nematoda. *Soil Biology Guide*, 8: 155-199.
- Friedman, M. J. 1990.** Commercial production and development. Entomopathogenic nematodes in biological control. CRC Press. Boca Raton, FL, 153-72 pp.



- García del Pino F. 1994.** Los nematodos entomopatógenos (Rhabditida: Steinernematidae y Heterorhabditidae) presentes en Cataluña y su utilización para el control biológico de insectos. Tesis de doctorado en ciencias biológicas. Universidad Autónoma de Barcelona. España.
- Gaugler, R. & G. M. Boush. 1979.** Nonsusceptibility of rats to the entomogenous nematode *Neoaplectana carpocapsae*. *Environmental Entomology*, 8: 658-660.
- Gaugler, R. & R. Han. 2002.** Production Technology», *Entomopathogenic Nematology*, New York, CABI Publishing, 289-310 pp.
- Georgis, R. & G. O. Poinar. 1994.** Nematodes as bioinsecticides in turf and ornamentals. En: A.R. Leslie y U.S. EPA, Eds. Handbook of integrated pest management for turf and ornamentals. Boca Raton, FL, CRC Press, 477-489 pp.
- Georgis, R., H. Kaya & R. Gaugler. 1991.** Effect of Sternernematid and Heterorhabditid nemátodos (Rhabditida: Steinernematidae) on nontarget arthropods. *Enviromental Entomology*, 20 (3): 815-822.
- Gijón H. A., G. Sánchez, V. Arriola. V. López, E. Santiago, F. Reséndiz, S. Santana. 2014.** Generación de nuevas estrategias de monitoreo y control de los insectos descortezadores *dendroctonus mexicanus*, *dendroctonus frontalis e ips lecontei*, mediante el uso de semioquímicos y entomopatógenos. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Conservación y Mejoramiento de Ecosistemas Forestales, INIFAP.
- Gijón-Hernández, A. R., Z. Trejo-Sandoval, C. M. López-Guzmán, L. Ramírez-Huerta, V. J. Arriola- Padilla & I. M. Pérez-Gálvez. 2015.** Caracterización y efectividad de *Trichoderma* spp., sobre insectos descortezadores de pino. *Entomología mexicana*, 2: 293 299.
- Girón, P. S., J. Ruiz-Vega, R. Pérez-Pacheco, J. A. Sánchez-García & T. Aquino-Bolaños. 2012.** Isolation of entomopathogenic nematodes and control of *Phyllophaga vetula* Horn in Oaxaca, México. *African J. Biotechnol*, 11: 16525-16531.
- Gobierno del Estado de Aguascalientes. 1994.** Periódico Oficial, Tomo LVII, Núm. 5.
- González Ramírez, M. 2006.** Presencia, identificación y patogenicidad de nematodos entomopatógenos (Rhabditidae: Heterorhabditidae, Steinernematidae) aislados de suelos del Pacífico Centro Mexicano. Tesis Doctoral. Área: Biotecnología. Universidad de Colima. Tecomán, Col.
- Grewal, P. S. 2000.** Mushroom pest. En: Lacey and H. K. Kaya, Eds. Field Manual of techniques in vertebrate pathology. L.A. Dordrecht, The Netherlands, Klower Academic publishers, 497-503 pp.
- Grifaldo-Alcántara, P. F. 2011.** Incidencia de nematodos entomopatógenos en áreas cañeras de Veracruz y su interacción con el barrenador de la caña de azúcar *Diatraea saccharalis*. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Edo. De México.
- Hara, A. H., R. Gaugler, H. K. Kaya & L. M. Lebeck. 1991.** Natural populations of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae) from the Hawaiian islands. *Environ. Entomol*, 20(1): 211-216.
- Hatab, M. A. & R. Gaugler. 1997.** Growth-Mediated Variations in Fatty Acid of *Xenorhabdus* sp. *Journal of Applied Microbiology*, 82:351-358.
- Herrmann, M., M. E. Mayer & R. J. Sommer. 2006a.** Nematodes of the genus *Pristionchus* are closely associated with scarab beetles and the Colorado potato beetle in Western Europe. *Zoology*, 109: 96-108.
- Herrmann, M., W. E. Mayer & R. J. Sommer. 2006b.** Sex, bugs and Haldane"s rule: the nematode genus *Pristionchus* in the United States. *Frontiers in zoology*, 3(14).
- Hickman C. P., L. S. Roberts & A. Parson. 2000.** La diversidad de la vida animal III, Principios integrales de zoología. Madrid, España. pp. 304-317.

- Hofstetter R.W., J. Dinkins-Bookwalter, T. S. Davis & K. D. Klepzig. 2015.** Symbiotic Associations of Bark Beetles. En: Bark Beetles. Biology and Ecology of native and invasive species. Academic Press, Elsevier, 6: 209-249.
- Hofstetter, R.W. & J. C. Moser. 2014.** Role of mites in insect-fungus associations. *Rev. Entomol* 59, 537–557.
- Hominick, W. M., A. P. Reid, D.A. Bohan & B. R. Briscoe. 1996.** Entomopathogenic nematodes: biodiversity, geographical distribution and the convention on biological diversity. *Biocontrol Science and Technology*, 6 317-331.
- Hominick, W. M. & B. R. Briscoe. 1990.** Occurrence of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) in British soils. *Parasitology*, 100: 295-302.
- Hominick, W.M., B. R. Briscoe, B. R., F. Del Pino, J. Heng, J. Hunt, D.J. Kozodoy, E., Mráček, Z., Nguyen, K. B., Reid, A. P. Spiridonov, S., Stock, P., Sturhan, D., Waturu, C., & Yoshida, M. 1997.** Biosystematics of entomopatogenic nematodes: current status, protocols and definitions. *Journal of Helminthology*, 71, 271-298.
- Hominick, W. M. 2002.** Biogeography. En: *Entomopathogenic Nematology*, R. Gaugler, Eds CAB Publishing, CAB International, New York, USA. 115-143.
- INE, 1993.** Informe de la Situación General en Materia del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente, 1991-1992. pp. 93.
- INE, 1999.** Programa de Manejo de la Reserva de la Biosfera Sierra Gorda. Desarrollo Gráfico Editorial. México. 173 p
- Iñiguez H. G. 1999.** Sistemas de clasificación de riesgo para *Dendroctonus frontalis* y *D. mexicanus* en "el manzano" en villa de Santiago, Nuevo León, México. Tesis de maestría en ciencias forestales en la Universidad Autónoma de Nuevo León. México.
- Islas, S. F. 1980.** Observaciones sobre la biología y el combate de los escarabajos descortezadores de los pinos: *Dendroctonus adjunctus* BRF; *D. mexicanus* Hpk. y *D. frontalis* Zimm. en algunas regiones de la República Mexicana. FAO. Boletín técnico No. 66.
- Jansson, R. K. 1993.** Introduction of exotic entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae and Steinernematidae) for biological control of insects: potential and problems. *Florida Entomologist*, 76: 82-96.
- Jiménez-Cortés J. G., J. Canales-Lazcano, N. Lara-Reyes, M. Rosenblueth, E. Martínez-Romero & J. Contreras-Garduño. 2016.** Microbiota from *Rhabditis regina* may alter nematode entomopathogenicity. *Parasitol Res*, Doi: 10.1007/s00436-016-5190-3.
- Kaya, H. K. & R. Gaugler. 1993.** Entomopathogenic nematodes. *Annual Review of Entomology*, 38: 181-206.
- Kaya, H. K. & A. M. Koppenhofer. 1999.** Biology of insecticides nematodes. En Polavarapu. Eds. Optima use of insecticidad nematodes in pest management. New Jersey, Rutgers University, 1-8 pp.
- Kinzer, G. W., A. F. Fentiman, Jr. T. L. Page, R. L. Foltz, J. P. Vité & G. B. Pitman. 1969.** Bark beetle attractants; identification, synthesis and field bioassay of a compound isolated from *Dendroctonus*. *Nature*, 221: 447-478.
- Kiontke K., Manegold A. & W. Sudhaus. 2001.** Redescription of *Diplogasteroides nasuensis* Takaki, 1941 and *D. magnus* Völk, 1950 (Nematoda: Diplogastrina) associated with Scarabaeidae (Coleoptera). *Nematology*, Vol. 3(8): 817-832.
- Klepzig, K. D., F. K. Raffa, & E. B. Smalley, 1991.** Association of insect-fungal complexes with Red Pine Decline in Wisconsin. *Forest Science*, 37: 1119–1139.
- Kolb, T.E., N. Guerard, R. W. Hofstetter & M. R. Wagner. 2008.** Attack preference of *Ips pini* on *Pinus ponderosa* in northern Arizona: tree size and bole position. *Agricultural and forest Entomology*, 8:295-303.

- Koppenhofer, A. M. 2000.** Nematodes. En Lacey. L. A; Kaya. H. K. Eds. Field Manual of Techniques in invertebrate Pathology. Kluwer. Dordrecht. *The Netherlands*: 283-301.
- Koppenh fer, A. M., P. S. Grewal, & E. M. Fuzy. 2007.** Differences in penetration routes and establishment rates of four entomopathogenic nematode species into four white grubs species. *J. Invertebr. Pathol*, 94: 184-195.
- Kreft, A., W. Kazimierczak, A. Sierpińska, H. Skrzypek, A. Skrabucha, M. Dybała & M. D wierzyńska. 2012.** Characterization of nematodes isolated from cockchafer *Melolontha* sp. (Coleoptera: Scarabaeidae). *Progress in plant protection* 52 (4): 1093-1097.
- Lacey, L. A., & H. K. Kaya. 2000.** Field manual of techniques in invertebrate pathology. *J. Invertebr. Pathol*, 84: 15-23.
- Landa, Z., P. Hornak, L. Osborne, A. Nov kov & E. Bursov. 2001.** Entomogenous fungi associated with spruce bark beetle *Ips typographus* L. (Coleoptera, Scolytidae) in the Bohemian Forest. *Silva Gabreta*, 6: 259–272.
- Lewis, E. E., J. Campbell, C. Griffin, H. K. Kaya, & A. Peters. 2006.** Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes. *Biol. Control*, 38: 66-79.
- Li P., C. Dai, H. Bao, L. Chen, D. Gao, G. Wang, J. Wang, H. Wang, G. Yedid & K. Zhang. 2015.** A new species of *Pristionchus* (Rhabditida: Diplogastridae) and its bacterial symbiont from Yixing, China. *J Nematol*, 47:190–197.
- Lindquist, E. E. 1967.** Mites and the regulation of bark beetle populations. *Proc. and Int. Congr. Acarol*, 389-399.
- Liu, J., & G. O. Poinar. 2000.** Control of insect pest with entomopathogenic nematodes: the impact of molecular biology and phylogenetic reconstruction. *Annual Review Entomology*, 45: 287-306.
- Long, E. O. & I. B. David. 1980.** Repeat Genes in Eukaryotes. *Annual Review of Biochemistry*, 49: 727-764.
- López, R. S., O: P: Román, B. J. Iturrondobeitia & L. A: Goldarazena. 2007.** Los Escoltidos de las coníferas del país vasco. Guía prctica para su identificación y control. 189 p. Recuperado en febrero 2016 de: <http://www.slideshare.net/gtfsaltominho/los-escoltidos-de-las-conferas-del-pas-vasco>.
- Maceto C., D. Bacerra & F. Rodríguez. 2009.** Identificación molecular de un nematodo parasi to de la babosa plagada *Derocera reticulatum* (müller 1774). *Revista Tumbaga*, Vol. 1 (4):149-167.
- Maciel Pérez L. H., E. S. Osuna- Ceja, M. A. Iba. s.f.** Determinación del potencial productivo de especies vegetales y la conservación del suelo y agua, como base sustentable a la conservación de la agricultura del Estado de Aguascalientes. INIFAP-SAGARPA.
- Magaña V. & C. Neri. 2012.** El reto de la sequía en México. *Revista México Social*, 1 (23): 12-14.
- Mayer, W.E., M. Herrmann & R. J. Sommer. 2007.** Phylogeny of the nematode genus *Pristionchus* and implications for biodiversity, biogeography and the evolution of hermaphroditism. *BMC Evolutionary Biology*, 7: 104. doi:10.1186/1471-2148-7-104
- McCoy, C.W., D. A. Shapiro, L. W. Duncan & K. Nguyen. 2000.** Entomopathogenic nematodes and other natural enemies as mortality factors for of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae). *Biological Control*, 19: 182-190.
- Mekete, T., R. Gaugler, K. B. Nguyen, W. Mandefro, & M. Tessler. 2005.** Biogeography of entomopathogenic nematodes in Ethiopia. *Nematropic*, 35: 31-36.
- Melo, R. V., H. D. Jiménez, N. Vargas & T. Q. Barreda. s.f.** El consumo de larvas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) fuente de nutrientes en dos estados de

su metamorfosis opción al combate de esta plaga. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. Recuperado en noviembre 2016 de: <file:///E:/ARTICULOS/228-232.pdf>.

- Merino, L. M. & A. I. France. 2009.** Nematodos entomopatógenos: Control biológico de insectos plaga de importancia económica. INIA Tierra adentro, Plagas y enfermedades INIA Quilamapu.
- Millar, L. C. & M. E. Barbercheck. 2001.** Interaction between endemic and introduced entomopathogenic nematodes in conventional-till and no till corn. *Biol. Control*, 22: 235-245.
- Miller, R. D., C. Asaro & C. W. Berisford. 2005.** Attraction of southern pine engravers and associated bark beetles (Coleoptera: Scolytidae) to ipsenol, ipsdienol, and lanierone in southeastern United States. *Journal of Economic Entomology*, 98:2058-2066.
- Miller, R. D., H. J. Borden, S. G. G. King & N. K. Slessor. 1991.** Ipsenol: An aggregation pheromone for *Ips latidens* (LECONTE) (Coleoptera: Scolytidae). *Journal of chemical Ecology*, 17(8): 1517-1527.
- Morrone, J. J. 2005.** Hacia una síntesis biográfica de México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 76 (2): 207-252.
- Moser, J. C., B. A. Fitzgibbon & K. D. Klepzig. 2005. The Mexican Pine Beetle, *Dendroctonus mexicanus*: First record in the United States and co-occurrence with Southern Pine Beetle- *Dendroctonus frontalis* (Coleoptera: Scolytidae or curculionidae: Scolytinae). *Entomological News*, 116 (4): 235-243.
- Mracek, Z. 1980.** The use of *Galleria* traps for obtaining nematode parasites of insects in Czechoslovakia (Lepidoptera: Nematoda, Steinernematidae). *Acta Entomol. Bohemoslov*, 77: 378-382.
- Nguyen, K. B. y D.J. Hunt. 2007. Entomopathogenic nematodes: systematics, phylogeny and bacterial symbionts. Brill Academic Pub. Leiden-Boston.
- Nishiwaki, H., K. Ito, M. Shimomura, K. Nakashima, & K. Matsuda. 2007. Insecticidal Bacteria Isolated from Predatory Larvae of the Antlion Species *Myrmeleon bore* (Neuroptera: Myrmeleontidae). *J. Invertebr Pathol*, 96(1): 80-88.
- Ordóñez-Reséndiz, M.M., R. Muñiz-Vélez & F. Gama-Rojas. 2008.** Curculiónidos (Coleópteros), en S. Ocegueda y J. Llorente- Bousquets (coords.), Catálogo taxonómico de especies de México, en Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. CONABIO. México, CD1.
- Orozco, M., G. Hueso, J. Chávez, A. Aquino, A. Vargas & A. Villalobos. 2008.** Obtención de Secuencias de DNAr ITS y LSU para la Identificación de un Aislado de Nematodo Entomopatógeno Nativo (Rhabditida: Steinernematidae). En XIX Semana nacional de investigación científica. Guadalajara. México, 155-160 pp.
- Pain, T. D. & S. L. Betram. 1995.** Management potential of semiochemicals for protection of trees from western pine beetle. Annual meeting of the Entomological Society of America Vol 318, 11-13 pp.
- Pedram, M. 2008.** *Longidorus kheirii* n. sp. (Nematoda: Longidoridae) from Iran. *Syst Parasitol*, 71:199–211.
- Pérez, De la C., M. A. Equihua, N. J. Romero, S. S. Sánchez & L. E. García. 2009.** Diversidad, fluctuación poblacional y plantas huésped de escolitinos (Coleóptera: Curculionidae) asociados con el agroecosistema cacao en Tabasco, México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 80:779-791.
- Petersen C., R. J. Hermann, M. V. Barg, R. Schalkowski, P. Dirksen, C. Barbosa & H. Schulenburg. 2015.** Travelling slug'space: possible invertebrate vectors of *Caenorhabditis* nematodes. *BMC Ecol* 15:19.
- Poinar, G. O. Jr. 1975.** Entomogenous nematodes: A manual and host list of insect-nematode associations. Primera Ed. Brill. Boston, USA. 321 p.

- Poinar, G. O. Jr. 1993.** Origins and phylogenetic relationships of the entomophilic rhabditids, *Heterorhabditis* and *Steinernema*. *Fundamental and Applied Nematology*, 16:333-338.
- Price, P. W. 1997.** *Insect Ecology*. Tercera Edición. New York: John Wiley. 874 p.
- Rae, R., M. Riebesell, I. Dinkelacker, Q. Wang, M. Herrmann, M. A. Weller, C. Dieterich & R. J. Sommer. 2008.** Isolation of naturally associated bacteria of necromenic *Pristionchus* nematodes and fitness consequences. *The Journal of Experimental Biology*, 211: 1927-1936.
- Ragsdale, E. J., N. Kanzaki & R. J. Sommer. 2014.** *Levipalatum texanum* n. gen., n. sp. (Nematoda: Diplogastridae), an androdioecious species from the south-eastern USA. *Nematology*, 16: 695-709.
- Ragsdale, E. J., N. Kanzaki & M. Herrmann. 2015.** Taxonomy and natural history: the genus *Pristionchus*. En: Sommer, R. J. Eds. *Pristionchus pacificus*. A nematode model for comparative and evolutionary biology. *Nematology Monographs and Perspectives* 11. The Netherlands, Brill, pp. 77-120.
- Realpe A., P. bustillo P & J. C. López N. 2007.** Optimización de la cría de *Galleria mellonella* (L.) para la producción de nematodos entomopatógenos parásitos de la broca del café. *Cenicafé*, 58(2):142-157.
- Reséndiz-Martínez J. F., B. Torre-Huerta, V. López-Gómez, A. Gijón-Hernández & G. Sánchez-Martínez. 2016.** Enemigos naturales de *Dendroctonus frontalis* Zimmerman, 1868 y *Dendroctonus mexicanus* hopkins, 1915 (Coleoptera: Scolytinae), capturados mediante semioquímicos en la reserva de la biosfera sierra gorda de Querétaro. *Entomología Forestal*, 3: 626-632.
- Reyes, H. M. 2003.** Patogenicidad de nematodos entomopatógenos (Nematoda: Steinemematidae, Heterorhabditidae) en larvas y pupas de mosca de la fruta *Anastrepha ludens* loew (diptera: tephritidae). Tesis de maestría. biotecnología. Universidad de Colima.
- Rivera, M. O. & D. Ruiz. 2009.** Evaluación de tratamientos para el control de *Dendroctonus mexicanus* Hopkins en el predio "Las Cruces", Chapingo, México. Tesis de Licenciatura. División de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma Chapingo, México.
- Robles, C. M. 2013.** Aislamiento, caracterización e identificación molecular de nemátodos de vida libre a partir de muestras de suelo. Tesis de Licenciatura. Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias Naturales Universidad Autónoma de Querétaro.
- Rodríguez, O. A., M. A. Equihua, T. J. Cibrián & V. E. Estrada. 2010.** Fluctuación de *Dendroctonus adjunctus* Blandford (Curculionidae: Scolytinae) y sus depredadores atraídos por frontalina+alfa-pineno, en la estación experimental de Zoquiapan, Edo. De México. *Boletín del museo de Entomología de la Universidad del Valle*, 11(1):20-27.
- Roman, J. & J. B. Beaver. 1983.** A survey of Puerto Rico soils for entomogenous nematodes which attack *Diaprepes abbreviatus* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *J. Agric. Univ. Puerto Rico*, 67(3): 311-316.
- Rosales, L. C., H. R. Rodríguez, L. Puente & J. García. 2009.** Cría masiva de nemátodos entomopatógenos para el control de insectos plaga, Aspectos fitosanitarios, INIA, Divulga, pp.12, 19.
- Safranyik, L. & P. M. Hall. 1990.** Strategies and tactics for mountain pine beetle management. Mountain Pine Beetle Taskn Force, B. C. Forest Service, Kamloops, B. C. (unPubl. Rep).
- Salas, L. M. 2002.** Distribución natural de nematodos entomopatógenos (Nematoda: Steinernematidae y Heterorhabditidae) en sistemas agroecológicos de Zacatecas. Tesis doctoral. Área de biotecnología. Universidad de Colima.

- Salinas-Moreno, Y., C. F. Vargas-Mendoza, G. Zúñiga, J. Victor, A. Ager & J. L. Hayes. 2010.** Atlas de distribución geográfica de los descortezadores del género *Dendroctonus* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) en México. Instituto Politécnico Nacional/Comisión Nacional Forestal. pp. 1-90.
- Sambrook, J., D.W. Russell. 2001.** Molecular Cloning. 3a. ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York. A Laboratory Manual.
- San-Blas E, S. R. Gowen & B. Pembroke. 2008.** Scavenging or infection Possible host choosing by entomopathogenic nematodes. *Nematology*, 10:251–259.
- Sánchez, G. 2008.** Una visión actual de la diversidad y distribución de los pinos de México. Madera y Bosques, primavera. Instituto de Ecología A. C, 14 (1): 107-120.
- Sánchez-Martínez, G., C. J. Mehmel, N. E. Gillette, E. González, J. A. López, J. C. Monárrez, J. L. García, S. R. Mori, H. E. Alanís, J. M. Mejía, M. Cano, M. A. Cortés & L. M. Torres. 2012.** Fundamentos para el control integral del Descortezador *Dendroctonus pseudotsugae barragani* Furniss en México. INIFAP, CIRNOC, Campo Experimental Pabellón. Folleto Técnico Núm. 46. p. 58.
- SARH, 1994.** Inventario Nacional Forestal, México. 63 p.
- Schulte, F., y G. O. Poinar. 1991.** Description of *Rhabditis* (*Rhabditoides*) *regina* n. sp. (Nematoda: Rhabditidae) from the body cavity of beetle larvae in Guatemala. *Rev de Nématologie*, 14:151–156.
- SEDES. 1993.** Estudio para la declaratoria de la Sierra Fría como área natural protegida. Vol. 2. Aguascalientes, México.
- Seijas, C. I. 2004.** Estudio de la nematofauna edáfica asociada a cultivos frutícolas de manzano (*malus domestica* borkh.) y a biotopos forestales de roble (*quercus robur* l.) en galicia como base previa al control biológico de plagas de babosas con nematodos zooparásitos. Tesis doctoral en biología. Universidad de santiago de compostela.
- Seinhorst, J. W., 1959.** A rapid method for the transfer of nematodes from fixative to anhydrous glycerin. *Nematologica*, 4:67-69.
- SEMARNAP, PROFEPA 1998.** Procuraduría Federal de Protección al Ambiente, Informe Triannual. 1995-1997 México. pp. 113-114.
- SEMARNAP, 1999.** Proyecto Planeación Territorial y Deforestación, Dirección General de Restauración y Conservación de Suelos, con base en INEGI, cartografía de Uso del Suelo y Vegetación. México.
- SEMARNAT. 2013.** Gestión ambiental, forestal y suelos. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Recuperado en enero 2016 de: [www.semarnat.gob.mx/temas/gestionambiental/forestalsuelos/Paginas/inicio.aspx](http://www.semarnat.gob.mx/temas/gestionambiental/forestalsuelos/Paginas/inicio.aspx)
- SEMARNAT. 2008.** Norma Oficial Mexicana NOM-019-SEMARNAT-2006, que establece los lineamientos técnicos de los métodos para el combate y control de insectos descortezadores. Diario Oficial. México, D. F. 23 de Julio de 2008.
- SENASICA. 2013.** Nemátodos en papa de importancia cuarentenaria en México, Protocolos de diagnóstico. Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria.
- Shamseldean, M. M. & M. M. Abd-Elgawad. 1994.** Natural occurrence of insect pathogenic nematodes (*Rhabditida*: *Heterorhabditidae*) in Egyptian soil. *Afro-Asian J. Nematol*, 2(4): 151-154.
- Shapiro-Ilan, D., E. E. Lewis & W. L. Tedders. 2003.** Superior efficacy observed in entomopathogenic nematodes applied in infected-host cadavers compared with application in aqueous suspension. *J. Invertebr. Pathol.* 83: 270-272.
- Shapiro-Ilan, D. y R. Gaugler. 2002.** Production technology for entomopathogenic nematodes and their bacterial symbionts. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 28: 137–146.

- Smart, G. C. Jr. 1995.** Entomopathogenic nematodes for the biological control of insects. *Journal of Nematology*, 27, 529 - 534.
- Smart, G. C. Jr. & K. B. Nguyen. 1994.** Role of entomopathogenic nematodes in biological control. En: Rosen, D., Bennett, F. D. y Capinera, J. L. Eds. *Pest management in the subtropics: Biological control a Florida perspectiva*, pp.231-252.
- Somwong P. & J. Petcharat. 2012.** Culture of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* (weiser) on artificial media. *ARNP Journal of Agricultural and Biological Science*, Vol 7(4): 229-232.
- Stark, R. W. 1982.** Generalized ecology and life cycle of bark beetles. In: Mitton, J. B. and K. B. Sturgeon. Eds. *Bark beetles of North American conifers: A system for the study of evolutionary biology*. Austin, TX: University of Texas Press. pp 21-45.
- Steiner, W. A. 1996.** Distribution of entomopathogenic nematodes in the Swiss Alps. *Rev. Suisse Zool*, 103(2): 439-452.
- Steinwender, B. M., H. W. Krenn & R. Wegensteiner. 2010.** Different effects of the insectpathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Deuteromycota) on the bark beetle *Ips sexdentatus* (Coleoptera: Curculionidae) and on its predator *Thanasimus formicarius* (Coleoptera: Cleridae). *Journal of Plant Diseases and Protection*, 117 (1): 33-38.
- Stevens, R. E. & H. W. Flakes Jr. 1974.** A roundheaded pine beetle outbreak in New Mexico: associated stand conditions and impact. *USDA For. Serv*, p. 4.
- Stock S.P., J. M. Campbell & S. A. Nadler. 2001.** Phylogeny of *Steinernema* Travassos, 1927 (Cephalobina: Steinernematidae) inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters. *Journal of Parasitology*, 87 (4): 877-889.
- Stock S. P., B. M. Pryory & H. K. Kaya. 1999.** Distribution of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae: Heterorhabditidae) in natural habitats in California, USA. *Biodiversity and Conservation*, 8 (1): 535-549.
- Stock, S. P., B. Rivera-Orduño & Flores-Lara. 2009.** *Heterorhabditis sonorensis* n. sp. (Nematoda: Heterorhabditidae), a natural pathogen of the seasonal cicada *Diceroprocta ornea* (Walker) (Homoptera: Cicadidae) in the Sonoran desert. *Journal of Invertebrate Pathology*.
- Stock, P., L. Uribe & L. Flores. 2008.** Apuntes curso. Aplicación Biotecnológica de los Nematodos Parásitos de Insectos. Universidad de Costa Rica.
- Stuart, R. J. & R. Gaugler. 1994.** Patchiness in populations of entomopathogenic nematodes. *J. Invertebr. Pathol*, (64): 39-45.
- Sudhaus W & A. Fürst von Lieven. 2003.** A phylogenetic classification and catalogue of the Diplogastridae (Secernentea, Nematoda) *J Nem Morph Syst.*, 6:43–90.
- Tambong, J. T. 2013.** Phylogeny of bacteria isolated from *Rhabditis* sp. (Nematoda) and identification of novel entomopathogenic *Serratia marcescens* strains. *Curr Microbiol*, 66:138–144.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, M. & S. Kumar. 2011.** MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology an Evolution*, 28: 2731-2739.
- Téllez-Jurado, A., M. Cruz-Ramírez, Y. Mercado-Flore, A. Asaff-Torres & A. Arana-Cuenca. 2009.** Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Revista Mexicana de Micología*, 30: 73-80.
- Triggiani, O. y G. O. Poinar Jr. 1976.** Infection of adult Lepidoptera by *Neoplectana carpocapsae* (Nematodoa). *Journal Invertebrate Pathology*, 27: 413-414.
- Ungerer, M. J., M. P. Ayres, & M. J. Lombardero. 1999.** Climate and the northern distribution limits of *Dendroctonus frontalis* Zimmerm. *Journal of Biogeography*, 26 (6):1133-1145.

- Uribe-Lorío, L., M. Mora, & S. P. Stock. 2005.** First record of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Costa Rica. *J. Invertebr. Pathol.*, 88: 226-231.
- Vázquez Montoya Elva Lorena. 2012.** Caracterización de nemátodos entomopatógenos aislados del Valle de Guasave, Sinaloa, México. tesis de maestría en recursos naturales y medio ambiente. instituto politécnico nacional.
- Viñuela, E.; M. González; H. Vogt & J. Jacas. 2002.** Efectos secundarios de los plaguicidas en los enemigos naturales. Necesidad de su estudio para la autorización de productos en Producción Integrada y otros modernos sistemas productivos. Primera parte. *Phytoma España*, 133: 21–25.
- Warwick, L.N., 1984.** *The biology of free-living nematodes*. Clarendon Press. Oxford. p. 251.
- White, G. F., 1927.** A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science*, 66: 302-303.
- Wood, S. L. 1985.** Aspectos taxonómicos de los Scolytidae. Memoria del Simposio Nacional de Parasitología Forestal. México, D. F. pp. 170-174.
- Woodring, L.J. & K.H. Kaya. 1988.** Steinernematid and Heterorhabditid nematodes. A Handbook of biology and techniques. Southern Cooperative Series Bulletin. A publication of the Nematode Subcommittee of the Southern Research Project S135-Entomopathogens for use in Pest Management Systems. Arkansas Agric. Exp. Stn., Fayetteville, Arkansas.
- Ye, W. 2015.** Characterisation of, and entomopathogenic studies on, *Pristionchus aeorivorus* (Cobb in Merrill & Ford, 1916) Chitwood, 1937 (Rhabditida: Diplogastridae) from North Carolina, USA. *Nematology*, 17: 567-580.
- Yoo, S. K., I. Brown & R. Gaugler: 2000.** Liquid Media Development for *Heterorhabditis bacteriophora*: Lipid Source and Concentration. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54:759-763.
- Zhang, C., J. Liu, M. Xu, J. Sun, S. Yang, X. An, G. Gao, M. Lin, R. Lai & Z. He. 2008.** *Heterorhabditoides Chongmingensis* Gen. Nov., Sp. Nov. (Rhabditida: Rhabditidae), a Novel Member of the Entomopathogenic Nematodes. *J. Invertebr. Pathol.*, 98(2): 153-68.
- Zúñiga, G., C. G Mendoza, R. Cisneros & M. Y. Salinas. 1999.** Zonas de sobreposición en las áreas de distribución geográfica de las especies mexicanas de *Dendroctonus* Erichson (Coleoptera: Scolytidae) y sus implicaciones ecológico-evolutivas. *Acta Zool. Mex. (N. S.)*, 77: 1-22.



## ANEXO 1. Glosario

**Anillo nervioso:** Forma parte del sistema nervioso y se encuentra rodeando al esófago, justo arriba del bulbo basal.

**Bulbo basal:** Parte muscular del esófago que se encarga de la succión de los alimentos para llevarlos al intestino.

**Campo lateral:** Ornamentaciones heterogéneas que se presentan en la cutícula de los juveniles infectivos (JI), las cuales presentan algunas incisuras a lo largo del cuerpo, sirviendo además como carácter taxonómico.

**Entomopatógeno:** Organismos patógenos que causan enfermedades a los insectos, pueden ser bacterias, hongos, virus, protozoos y nematodos.

**Espícula:** Órgano genital, accesorio de penetración ubicado en el extremo de la cola del macho de los nematodos que desemboca en la cloaca. Son modificaciones queratinizadas pareadas (varillas) de la cutícula.

**Estoma:** Se refiere a la boca o cápsula oral.

**Foresis:** Asociación biológica en la cual organismos pequeños se adhieren o se sujetan en el exterior del cuerpo de otro más grande, sin más consecuencia que el transporte de los primeros.

**Gubernáculo:** Estructura del nematodo macho que se encarga de guiar a las espículas, para ayudar en la copulación.

**Hemocele:** Cavidad general del cuerpo que está subdividida en tres senos (pericárdico, perivisceral y perineural) por donde circula la hemolinfa.

**Hemolinfa.** Líquido circulatorio en los insectos.

**Hermafrodita:** Organismo que reúne ambos sexos en el mismo individuo.

**In vitro:** Experimento llevado a cabo en un tubo de ensayo, o generalmente en un ambiente controlado fuera de un organismo vivo.

**In vivo:** Experimento hecho dentro o en el tejido vivo de un organismo vivo, por oposición a uno parcial o muerto.

**Istmo:** Región angosta que forma parte del esófago, ubicado entre el metacorpus o bulbo medio y el postcorpus o bulbo basal.

**Juvenil Infeccioso:** Estadio larval encargado de buscar al hospedero y que está envuelto por la muda del Juvenil 2 y presenta grandes cantidades de reservas nutritivas.

**Metacorpus:** Forma parte del corpus ubicado entre el procorpus y el postcorpus; también se le conoce como bulbo medio.

**Papilas genitales:** Proyecciones ubicadas en la región posterior de los machos, cuyo número y posición es considerado como carácter taxonómico.

**Parasitismo.** Proceso por el cual una especie amplía su capacidad de supervivencia utilizando a otras especies para que cubran sus necesidades básicas y vitales, que no tienen por qué referirse necesariamente a cuestiones nutricionales, y pueden cubrir funciones como la dispersión o ventajas para la reproducción de la especie parásita, entre otras.

**Patogenicidad:** Capacidad de un agente infeccioso de producir enfermedad en un huésped susceptible.

**Poros excretor:** Forma parte del sistema excretor de los nematodos, y funciona básicamente como osmoregulador.

**Procorpus:** Primera región del esófago que se ubica en el corpus antes del bulbo medio.

**Septicemia:** Infección en la hemolinfa causada por la invasión y multiplicación de bacterias y presencia de toxinas que pueden causar la muerte del insecto.

**Simbiosis:** Relación estrecha y benéfica entre organismos de diferentes especies. A los organismos involucrados se les denomina simbiosis.

**Velum:** Estructura presente o ausente en machos, transparente que parte del calomus y suele terminar o no en la punta de la espícula.