



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE
LA VIDA Y LA AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

**TEMA: IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE NEMATODOS
ENTOMOPATÓGENOS MEDIANTE LA TÉCNICA PCR Y
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO, EN
AISLAMIENTOS PERTENECIENTES A LA COLECCIÓN DE LA
ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA - INIAP**

AUTOR: PALLO ALOMOTO, BYRON PATRICIO

DIRECTORA: PhD. PROAÑO TUMA, KARINA ISABEL

SANGOLQUÍ

2017



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “**IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS MEDIANTE LA TÉCNICA PCR Y MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO, EN AISLAMIENTOS PERTENECIENTES A LA COLECCIÓN DE LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA - INIAP**” realizado por **BYRON PATRICIO PALLO ALOMOTO**, ha sido revisado en su totalidad y analizado por el software anti-plagio, el mismo cumple con los requisitos teórico, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizar al señor **BYRON PATRICIO PALLO ALOMOTO** para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 4 de septiembre del 2017

Una firma manuscrita en tinta azul que parece decir "Karina Proaño".

KARINA PROAÑO, Ph.D
DIRECTORA



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, **BYRON PATRICIO PALLO ALOMOTO** con cédula de identidad N° 1720132271 declaro que este trabajo de titulación “**IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS MEDIANTE LA TÉCNICA PCR Y MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO, EN AISLAMIENTOS PERTENECIENTES A LA COLECCIÓN DE LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA - INIAP**”, ha sido desarrollado considerando los métodos de investigación existente, así como también se ha respetado los derechos intelectuales de terceros considerándose en las citas bibliográficas.

Consecuentemente declaro que este trabajo es de mi autoría en virtud de ello me declaro responsable del contenido, veracidad y alcance de la investigación mencionada.

Sangolquí, 4 de septiembre del 2017

BYRON PATRICIO PALLO ALOMOTO

C.C. 1720132271



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN

Yo, **BYRON PATRICIO PALLO ALOMOTO**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar en la biblioteca Virtual de la institución el presente trabajo de titulación, “**IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS MEDIANTE LA TÉCNICA PCR Y MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO, EN AISLAMIENOS PERTENECIENTES A LA COLECCIÓN DE LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA - INIAP**” cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad.

Sangolquí, 4 de septiembre del 2017

BYRON PATRICIO PALLO ALOMOTO

C.C. 1720132271

DEDICATORIA

A mis Padres María y Cristóbal

Porque han sabido formarme con buenos valores, hábitos y sentimientos. Su apoyo, guía, amor incondicional y lucha constante ha constituido mi pilar principal para cumplir esta meta.

A mi sobrino Ismael

Porque su llegada a este mundo ha llenado de alegría mi hogar y me ha hecho experimentar el amor más puro, noble, desinteresado e inocente.

A mi tía Hilda

Por su enseñanza de que la humildad es la llave maestra para ingresar a cualquier habitación de la vida y que la verdadera felicidad está en saber compartir con los seres amados.

A mis niños Dennis, Joselin y Kassandra

Porque han hecho de mi un ejemplo en sus vidas y me recuerdan que siempre hay que luchar y enfrentar cualquier dificultad sin pensaren la rendición.

Byron Patricio Pallo Alomoto

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme salud, vida, cuidarme y acompañarme en todo momento haciendo posible lograr mis metas.

A mis padres quienes, por su arduo trabajo, me dieron la posibilidad de culminar mi carrera profesional la cual constituye una herencia valiosa en mi vida, pero en especial agradezco a mi madre que ante sus ojos seguiré siendo su “pequeño” sin importar la edad que siga cumpliendo; por cuidar de mí en todo momento y haberme inculcado buenos valores haciendo de mí una persona correcta, honesta, humilde y justa; por ser mi ejemplo de lucha y perseverancia enseñándome a que siempre debo superar las dificultades y a luchar por lo que quiero sin pensar en la posibilidad de una rendición. Ahora comprendo que el sentimiento de alegría y felicidad puede originarse solamente al pronunciar la palabra MAMA. ¡Dios te bendiga!

A mi tutora, Dra. Karina Proaño por la guía y la confianza brindada para la realización de este trabajo; por las enseñanzas académicas que finalmente aplique en la realización de esta investigación y finalmente por incentivar me a ser un buen investigador llevando siempre en mi mente la frase de “querer es poder”.

A mi tía Hilda Alomoto e hijos que siempre han estado pendientes de mi bienestar y salud y que cada fin de semana nos alegran con sus visitas para compartir momentos y fortalecer los lazos familiares.

Al “Flaquito” Joel Quinteros, quien con su compañía y ayuda me ha dado un estímulo en esta difícil etapa de estudiante y con quien he compartido las experiencias más placenteras de mi vida. Su espontaneidad me ha hecho entender que las oportunidades son pasajeras y que cuando se presenten hay que tomarlas sin pensarlo mucho. Gracias también por enseñarme que el mundo es de los “locos” ya que ellos se atreven hacer lo que los demás etiquetan con la palabra imposible. ¡Gracias Flaco!

A mi querida amigaaaaa Dany Navarrete quien me ha brindado su cariño desinteresado y me ha demostrado ser una persona leal, fiel y sincera. Siempre valore tus

“empujoncitos” cuando sentía que no podía seguir con la carrera pero me hacías comprender que el cansancio es temporal y que la satisfacción es para siempre. Contigo no solo he compartido momentos universitarios, sino también momentos familiares ya que me has acogido en tu hogar y me consideras como un miembro más de tu familia.

A mi amiga Pao Iturralde cuya risa particular se identificaba a metros de distancia y me hacía pensar ¡Oh ahí viene la alegría del grupo!. De ti aprendí que a pesar del mal momento que pudiéramos estar atravesando siempre hay que reír incluso de las tonterías y locuras que uno mismo comete.

Al Departamento de Protección Vegetal y Departamento Nacional de Biotecnología del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), y al Laboratorio de Caracterización de Nanomateriales de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, en especial al Ing. Pablo Llumiquinga, Lcda. Katerine Orbe, Ing. Johanna Buitrón, Ing. Karla Vizuete y Dr. Carlos Arroyo por la acogida en sus laboratorios y por haberme brindado la ayuda necesaria para poder realizar este trabajo.

Finalmente extendiendo mi agradecimiento al Ing. William Viera, Ing. Francisco Báez y Dr. Trevor Jackson por darme la oportunidad de ser parte del proyecto Biocontrol for sustainable farming systems, Ecuador de Ag Research - Nueva Zelanda, y por darme el financiamiento para que se pueda realizar el mismo.

Gracias querida ESPE, por haberme brindado los más hermosos recuerdos y el título universitario.

Byron Patricio Pallo Alomoto

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN	ii
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD	iii
AUTORIZACIÓN	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
RESUMEN	xv
ABSTRACT	xvi
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Formulación del problema.....	1
1.2 Justificación del problema.....	3
1.3 Objetivos de la investigación.....	5
1.3.1 Objetivo general de la investigación.....	5
1.3.2 Objetivos específicos de la investigación.....	5
1.4 Marco teórico.....	5
1.4.1 Nematodos entomopatógenos (NEPs).....	5
1.4.1.1 Generalidades.....	5
1.4.1.2 Ciclo de vida.....	8
1.4.1.3 Simbiosis nematodo-bacteria.....	9
1.4.1.4 Diferencias entre el género <i>Steinernema</i> y <i>Heterorhabditis</i>	10
1.4.2 Taxonomía.....	12
1.4.3 Morfología.....	14
1.4.3.1 Morfología general del género <i>Steinernema</i>	14
1.4.3.2 Morfología general del género <i>Heterorhabditis</i>	16
1.4.4 Aislamiento, multiplicación y almacenamiento de NEPs.....	17
1.4.5 Identificación de los nematodos entomopatógenos (NEPs).....	18
1.4.5.1 Identificación morfológica.....	18
1.4.5.2 Identificación molecular.....	21

1.5	Hipótesis de la investigación	23
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS		24
2.1	Participantes	24
2.2	Zona de estudio	24
2.3	Metodología.....	24
2.3.1	Renovación de los aislamientos almacenados.....	24
2.3.2	Obtención de especímenes	26
2.3.3	Análisis moleculares	26
2.3.3.1	Extracción de ADN.....	27
2.3.3.2	Amplificación de fragmentos por PCR.....	27
2.3.3.3	Cuantificación de ADN	29
2.3.3.4	Análisis de productos en gel de agarosa	30
2.3.3.5	Análisis por secuenciación	30
2.3.3.6	Análisis filogenético	30
2.3.4	Análisis por microscopía electrónica de barrido (MEB).....	31
CAPÍTULO III: RESULTADOS		34
3.1	Análisis moleculares.....	34
3.1.1	Extracción y cuantificación del ADN	34
3.1.2	Amplificación del ADN por PCR	34
3.1.3	Secuenciación de los aislamientos	36
3.1.4	Análisis de las secuencias	37
3.1.5	Análisis filogenético.....	38
3.2	Caracterización morfológica	40
3.2.1	Infectivos juveniles (IJ).....	41
3.2.2	Especímenes machos de primera generación	42
3.2.3	Especímenes machos de segunda generación	44
3.2.4	Especímenes hembras de primera generación.....	44
3.2.5	Especímenes hembras de segunda generación.....	46
CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN.....		47
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES		54
CAPÍTULO VI: RECOMENDACIONES.....		55

CAPÍTULO VII: BIBLIOGRAFÍA56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especies de NEPs disponibles comercialmente y grupo de plagas a los que controlan.	7
Tabla 2. Diferencias entre el género <i>Steinernema</i> y <i>Heterorhabditis</i>	11
Tabla 3. Principales caracteres morfológicos de nematodos entomopatógenos (NEPs).	19
Tabla 4. Concentraciones y volúmenes para PCR para amplificación de la región D2D3.	28
Tabla 5. Condiciones de PCR para la amplificación en el termociclador ABI Applied Biosystems A24811.	28
Tabla 6. Concentraciones y volúmenes para PCR para amplificación de la región ITS.	29
Tabla 7. Condiciones de PCR para la amplificación en el termociclador ABI Applied Biosystems A24811.	29
Tabla 8. Estructuras a visualizar mediante microscopía electrónica de barrido (MEB).	31
Tabla 9. Datos de la cuantificación del ADN extraído de 1 hembra adulta por cada aislamiento.	34
Tabla 10. Tamaño de las regiones amplificadas.	36
Tabla 11. Especie identificada y el número de accesión de la especie con la que presentó una alta identidad.	37
Tabla 12. Mediciones con MEB de <i>S. feltiae</i> por estadios.	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de los nematodos entomopatógenos	9
Figura 2. Larvas de <i>Galleria mellonella</i> infectadas por nematodos entomopatógenos	12
Figura 3. Diagramas para la identificación del género <i>Steinernema</i>	15
Figura 4. Diagramas para la identificación del género <i>Heterorhabditis</i>	16
Figura 5. Proceso de amplificación de ADN por técnica PCR	22
Figura 6. Representación esquemática de los genes ribosomales de los nematodos entomopatógenos.....	23
Figura 7. Renovación de los aislamientos.....	25
Figura 8. Obtención de especímenes adultos	26
Figura 9. Regiones del ADNr que se amplificaron junto con el par de <i>primers</i>	27
Figura 10. Preparación de muestras de NEPs para la visualización en el MEB	33
Figura 11. Fotografía de productos amplificados por PCR de la región ITS del ADNr de los aislamientos CB13, H04D, H01G y 2TH	35
Figura 12. Fotografía de productos amplificados por PCR de la región D2/D3 del ADNr de los aislamientos CB13, H04D, H01G y 2TH	35
Figura 13. Relación filogenética de los 4 aislamientos de la EESC con 16 especies de <i>S. feltiae</i> , partiendo de las secuencias de la región ITS del ADNr y empleando el método de máxima parsimonia	38
Figura 14. Relación filogenética de <i>Steinernema feltiae</i> del INIAP con 17 especies de <i>Steinernema</i> basado en el análisis de la región D2D3 del gen 28S rDNA, utilizando el método de máxima parsimonia.	39
Figura 15. Micrografías de un infectivo juvenil de <i>Steinernema feltiae</i>	41

Figura 16. Micrografías de especímenes machos de *Steinernema feltiae*.....43

Figura 17. Micrografías de especímenes hembras de *Steinernema feltiae*45

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN:	Ácido Desoxirribonucleico
DNPV:	Departamento Nacional de Protección Vegetal
DNB:	Departamento Nacional de Biotecnología
dNTPs:	Desoxirribonucleótidos trifosfatos
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
EESC:	Estación Experimental Santa Catalina
IJ:	Infectivo juvenil
INIAP:	Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias
ITS:	Espaciador transcrito interno
NEP:	Nematodo Entomopatogeno
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
Pb:	Pares de bases
TAE:	Tris, acetato y EDTA
MEB:	Microscopía electrónica de barrido
mL:	Mili litro
mM:	Mili molar
ng:	Nano gramo
μL:	Micro litro

RESUMEN

En las últimas tres décadas la agricultura de Ecuador se ha visto afectada por el ataque de insectos plaga. Los agricultores, para proteger los cultivos, han optado por el uso de pesticidas, sin embargo, en la actualidad se busca métodos alternativos que sean amigables con el ambiente. Los nematodos entomopatógenos (NEPs) constituyen una alternativa ya que son parásitos obligados de muchas especies de insectos plaga. Esta investigación tuvo como objetivo identificar especies de NEPs de cuatro aislamientos (género *Steinernema* y *Heterorhabditis*) pertenecientes a la EESC – INIAP mediante técnica PCR y microscopía electrónica de barrido (MEB). La metodología a seguir consistió en la extracción de ADN, amplificación por PCR de las regiones ITS y D2D3, secuenciación y un análisis filogenético. Por otro lado la caracterización morfológica se llevó a cabo mediante MEB. Los resultados obtenidos mostraron que la amplificación de la región ITS y los segmentos de expansión D2D3 presentaron una longitud de 800 y 620 pb., respectivamente. Los amplicones se secuenciaron y la homología por BLASTING mostró un 99 % de identidad con *Steinernema feltiae*; sin embargo 2 secuencias que amplificaron la región ITS presentaron porcentajes de identidad menores al 90%. Además, *S. feltiae* fue identificada como única especie en los cuatro aislamientos y sus características morfológicas observadas por MEB indican que se asemeja a las características reportadas bibliográficamente a esta especie. En cuanto a especies del género *Heterorhabditis*, no se encontraron en este estudio. Este trabajo presenta los resultados iniciales de las especies de NEPs que pueden ser identificadas en Ecuador.

PALABRAS CLAVE:

- **NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS**
- **STEINERNEMA**
- **HETERORHABDITIS**
- **REGIÓN ITS/D2D3**
- **MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO**

ABSTRACT

In the last three decades the agriculture of Ecuador has been affected by the attack of insect pests. Farmers, to protect crops, have opted for the use of pesticides, however, alternative methods to combat agricultural pests that be more environmentally friendly are currently being sought. The entomopathogenic nematodes (NEPs) are an alternative since they are obligate parasites of many pest insect species. This research aimed to identify NEPs species from four isolates (genus *Steinernema* and *Heterorhabditis*) belonging to EESC - INIAP using PCR technique and scanning electron microscopy (SEM). The methodology to be followed consisted of DNA extraction, PCR amplification of the ITS and D2D2 regions, sequencing and phylogenetic analysis. In contrast, the morphological characterization was carried out by MEB. The results obtained showed that the amplification of the ITS region and the D2D3 expansion segments had a length of 800 and 620 bp., respectively. Amplicons were sequenced and the homology by BLASTING showed a 99% identity with *Steinernema feltiae*; however, 2 sequences that amplified the ITS region had identity percentages lower than 90%. In addition, *S. feltiae* was identified as unique specie in the four isolates and its morphological characteristics observed by SEM indicate that it resembles the characteristics reported bibliographically to this species. No species of the genus *Heterorhabditis* were found in this study. This paper presents the initial results of species of NEPs that can be identified in Ecuador.

KEY WORDS:

- **ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES**
- **STEINERNEMA**
- **HETERORHABDITIS**
- **ITS/D2D3 REGION**
- **SCANNING ELECTRON MICROSCOPY**

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema

Ecuador, por su privilegiada situación geográfica y sus pisos climáticos, es considerado como un país con gran potencial agrícola; sin embargo, en las últimas tres décadas se ha visto que muchos cultivos de importancia económica son susceptibles al ataque de muchos insectos plaga y enfermedades (Argotti *et al.*, 2010).

Los agricultores, con el fin de proteger los cultivos o plantas del ataque de insectos plaga, han optado por la utilización de pesticidas químicos que a pesar de su alta eficiencia no han demostrado ser sostenibles a lo largo del tiempo, debido a que provocan resistencia de los insectos plaga a los principios activos, destruyen la fauna nativa y contaminan suelos y aguas (Sáenz, 2005; Argotti *et al.*, 2010).

Entre los cultivos de importancia económica en la sierra ecuatoriana se encuentra la papa cuyas plagas como el “Gusano Blanco” (*Premnotrypes vorax*) y el complejo “Polillas de la papa” (*Tecia solanivora*, *Symmetrischema tangolias* y *Phthorimae aoperculella*) han ocasionado pérdidas del 50% y 40% respectivamente (Gallegos, 2002; SENASA, 2016), cuando no se aplica un control adecuado. Otro cultivo de mayor consumo es el maíz, cuya plaga denominada “Gallina Ciega” (*Phyllophaga* sp.) ha ocasionado pérdidas cercanas al 32% en la producción del grano ya que es un cultivo altamente susceptible a esta plaga (Arteaga, 2015; Cueva, 2014).

En la actualidad las investigaciones buscan métodos alternativos como el control cultural, control mediante enemigos naturales, control genético y control químico natural que ayuden a reducir la utilización de pesticidas y a su vez incentiven a la búsqueda de enemigos naturales (parásitos, predadores y patógenos) para combatir plagas agrícolas de interés económico (Rogg, 2000; Maggiorani & Gudiño, 2000). Entre los organismos controladores más utilizados a nivel mundial se encuentran los virus, bacterias, hongos y nematodos (Baddi & Abreu, 2006).

Los nematodos que parasitan insectos, conocidos como nematodos entomopatógenos (NEPs), constituyen una perspectiva promisoriosa para el control de insectos plaga en cultivos de importancia económica (Argotti *et al.*, 2010). De las 30 familias de nematodos descritas (Koppenhofer, 2007), los Steinernematidae y Heterorhabditidae se caracterizan por ser controladores biológicos efectivos de insectos plaga (Kaya & Gaugler, 1993; Koppenhofer, 2007). Su utilización a nivel de laboratorio y campo requiere la identificación y caracterización de las especies dentro de cada género, para posteriormente realizar pruebas de patogenicidad, conocer sus hospederos y finalmente involucrarlos en formulados como un producto rentable (Sáenz, 2005).

El proceso de identificación de especies de NEPs se realiza mediante claves taxonómicas (Nguyen & Smart, 1996); sin embargo, con el creciente número de especies descritas y el hecho de que dentro de un mismo género se encuentran individuos morfológicamente muy similares, esta metodología ha sido de uso limitada (Poinar, 1990; Hominick, 2002), ya que puede estar sometida a varios errores (Stock, 2002) y requiere una alta experiencia para poder discriminar una especie de otra (Nguyen & Smart, 1996).

Por lo tanto, con el fin de superar ésta dificultad, las actuales investigaciones se enfocan en buscar métodos complementarios que faciliten la detección y caracterización de especies de nematodos (Joyce *et al.*, 1994; Hominick *et al.*, 1997). Las técnicas moleculares y de microscopía electrónica de barrido (MEB) constituyen métodos complementarios que, actualmente han revolucionado la genética y taxonomía de nematodos (Stock, 2002; Eisenback, 1991).

En Ecuador, no se cuentan aún con registros de especies de NEPs, así como datos morfológicos o moleculares, ya que la identificación ha llegado sólo hasta nivel de género estableciéndose colecciones como los que dispone el Departamento Nacional de Protección Vegetal (DNPV) de la Estación Experimental Santa Catalina (EESC) del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). Estas colecciones se obtuvieron de muestras de suelo de las provincias de Carchi, Chimborazo, Cotopaxi y Tungurahua entre los años 2004-2006, a partir de un estudio que tuvo como tema “colección, patogenicidad y caracterización ecológica de nematodos parásitos de insectos

en gusano blanco (*Premnotrypes vorax* hustache) en Ecuador” (Hernández, 2006). En dicho estudio se determinó la presencia de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis*, las cuales, en pruebas de patogenicidad, presentaron porcentajes de mortalidad superiores al 50% y 90% en gusano blanco y *Galleria mellonella*, respectivamente (Hernández, 2006). Además en estudios posteriores han demostrado también eficiencia en el combate de otras plagas como *Tecia solanivora* (INIAP, 2006), que atacan cultivos de papa, y *Phyllophaga* sp. (INIAP, 2004), que ataca cultivos de maíz que son de importancia económica para el país; sin embargo se desconoce aún las especies que puedan existir en cada aislamiento.

1.2 Justificación del problema

En Ecuador, la agricultura constituye la actividad primaria más destacada de la economía nacional después de la explotación petrolera (Larrea, 2016). Debido a los problemas reportados por el ataque de insectos plaga en los cultivos, los agricultores han optado por encontrar nuevos métodos de manejo de insectos plaga que sean más amigables con el medio ambiente (Georgis & Hague, 1991), y es así que la industria agrícola ha visto en los nematodos entomopatógenos (NEPs) una nueva alternativa para combatir insectos plaga. Para el desarrollo de esta técnica de combate de insectos plaga, las investigaciones se enfocan en la identificación y aplicación de NEPs como un producto rentable en forma de bioplaguicidas (Campos-Herrera *et al.*, 2012).

Las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae son los grupos más importantes dentro del control biológico, debido a que presentan ciertas ventajas sobre los pesticidas químicos (Smart, 1995). Entre las ventajas más importantes se puede mencionar la fácil aplicación con equipos convencionales, alta virulencia, rango de hospederos de una cepa o especie es generalmente limitado (no causan mortalidad indiscriminada), rápida mortalidad del huésped, alto potencial reproductivo, compatibilidad con otros organismos entomopatógenos e inocuidad para el ambiente, hombre y animales vertebrados (Kaya, 1990; Sáenz, 2005; Alatorre-Rosas & Kaya, 1990).

La identificación de especies de NEPs se basa tradicionalmente en observaciones de características morfológicas y morfométricas, mismas que se realizan mediante

microscopía óptica; sin embargo, en la actualidad, estas observaciones se complementan con la Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), ya que permite: detectar diferencias no observables con el microscopio óptico entre poblaciones o razas de especies, agrupar especies taxonómicamente y, en algunos estudios, realizar reconstrucciones filogenéticas (Eisenback, 1991).

Otra técnica complementaria a los análisis morfológicos tradicionales son las técnicas moleculares, tales como: Amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD), Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y la secuenciación del ADN, siendo las dos últimas las más utilizadas por su bajo costo y facilidad de manejo (Stock, 2002; Hominick *et al.*, 1997; Kuwata *et al.*, 2006). Estas técnicas han permitido identificar nuevas especies de una manera objetiva, rápida y repetible e interpretar relaciones filogenéticas dentro y entre las especies a diferentes niveles taxonómicos (Stock, 2002; Peteira *et al.*, 2008; Maceto *et al.*, 2009; Joyce *et al.*, 1994).

Conociendo la importancia de los NEPs y partiendo de los datos obtenidos en un estudio preliminar realizado en el 2006 por Hernández en el cual se determinó la existencia de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis* en base a las características de coloración del insecto infectado, se requiere identificar y caracterizar los especímenes presentes en la colección del DNPV de la EESC del NIAP, mediante la técnica PCR y MEB para, posteriormente, continuar con estudios de patogenicidad en insectos plaga como gusano blanco, el complejo polilla de la papa y gallina ciega que afectan a cultivos de interés como papa y maíz, y finalmente, aplicarlos como bioplaguicidas en un Plan de Manejo Integrado de Plagas y Agricultura Sostenible.

Con este estudio se pretende también eliminar aislamientos con especímenes duplicados y su vez disponer de colecciones purificadas y conservar aislamientos sin alteraciones morfológicas, fisiológicas o genéticas hasta que requieran usarse en estudios ecológicos, taxonómicos, genéticos, filogenéticos y biogeográficos.

La investigación se llevó a cabo en el Departamento Nacional de Protección Vegetal (DNPV), Departamento Nacional de Biotecnología (DNB) del INIAP y el Laboratorio de Caracterización de Nanomateriales de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, los cuales disponen de herramientas y equipos necesarios para la identificación de especies mediante morfología y técnicas moleculares.

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general de la investigación

Identificar especies de nematodos entomopatógenos mediante la técnica PCR y microscopía electrónica de barrido, en aislamientos pertenecientes a la colección de la Estación Experimental Santa Catalina – INIAP.

1.3.2 Objetivos específicos de la investigación

- Identificar molecularmente las especies de nematodos entomopatógenos presentes en la colección de la EESC mediante amplificación de la región D2D3 e ITS con primers universales y secuenciación.
- Determinar la relación filogenética de las especies de nematodos entomopatógenos identificados según bases de datos científicas.
- Caracterizar morfológicamente las especies de nematodos entomopatógenos de cada aislamiento mediante microscopía electrónica de barrido.

1.4 Marco teórico

1.4.1 Nematodos entomopatógenos (NEPs)

1.4.1.1 Generalidades

Los nematodos se encuentran distribuidos en diversos hábitats del planeta como, ríos, lagos, suelos y otros ambientes acuático-terrestres. Entre la enorme diversidad de

nematodos, algunos han desarrollado una simbiosis con bacterias patogénicas cuya asociación provoca la muerte letal de sus huéspedes. A estos nematodos se los conoce como “entomopatógenos” y esencialmente sirven como vectores móviles de bacterias patógenas que llevan en su sistema digestivo (Dillman & Sternberg, 2012).

Investigaciones extensas a lo largo de las últimas tres décadas, han centrado su atención en nematodos entomopatógenos (NEPs) de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis* debido a que incluyen la mayor cantidad de especies entomopatógenas (Lacey & Georgis, 2012) y han sido aislados en todos los continentes a excepción de la Antártida (Hominick, 2002; Razia & Sivaramakrishnan, 2014). Ambos géneros no se relacionan filogenéticamente (Blaxter *et al.*, 1998), pero se ha comprobado que existen similitudes en cuanto a morfología y ecología debido a que presentan una evolución convergente (Poinar, 1990).

Los NEPs son considerados como potenciales controladores biológicos (Kaya & Gaugler, 1993; Koppenhofer, 2007), ya que el rango efectivo de huéspedes de una especie o cepa es generalmente bastante estrecho, por lo tanto no causan mortalidad indiscriminada (Smart, 1995). Entre las ventajas más importantes se encuentra la facilidad de aplicación, capacidad de localizar activa o pasivamente a su hospedador, alta virulencia, rápida mortalidad del huésped, alto potencial reproductivo, afinidad con otros organismos entomopatógenos (*Paenibacillus popilliae*, *Bacillus thuringiensis*, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Isaria fumosorosea*), seguros para el ambiente, fauna y flora y compatibilidad con una amplia gama de pesticidas químicos y biológicos utilizados en los programas de Manejo Integrado de Plagas (Alatorre-Rosas & Kaya, 1990; Sáenz, 2005; Lacey & Georgis, 2012; Swati & Gaurav, 2015).

Estudios a nivel de laboratorio y campo han demostrado que poblaciones de varios insectos de los órdenes, tales como: lepidópteros, coleópteros, dípteros y ortópteros son susceptibles al ataque de los NEPs (Lacey *et al.*, 2001; Akhurst & Smith, 2002). En la tabla 1 se muestran las especies de NEPs disponibles comercialmente en algunos países de Europa, Asia y Norte América junto con el grupo de insectos plaga que logran controlar en determinados cultivos.

Tabla 1

Especies de NEPs disponibles comercialmente y grupo de plagas a los que controlan

Grupo plaga	Nombre común	Sitio de aplicación	Producto de interés	Especie de NEP
Coleóptera				
Chrysomelidae	Escarabajo pulga	Suelo	Menta, papa, remolacha,	Sc
Chrysomelidae	Gusano de la raíz	Suelo	Maíz, maní, vegetales	Sc, Sr
Curculionidae	Gorgojo	Césped	Pastos	Sc, Hb
Scarabaeidae	Gusanos blanco	Suelo, Césped	Haba, ornamentales	Sg, Hb, Hm
Díptera				
Agromyzidae	Minadores de hoja	Follaje	Ornamentales, vegetales	Sc
Sciaridae	Moscas sciaridas	Suelo	Ornamentales, vegetales, setas	Sf
Muscidae	Mosca común	Cebo	Criaderos de animales	Sc, Sf, Hb
Lepidóptera				
Carposinidae	Mariposa barrenadora de melón	Suelo	Manzana	Sc
Tortricidae	Mariposa manzana	Folículo	Manzana, pera	Sc
Noctuidae	Gusanos cortadores	Suelo, Turba	Ornamentales, vegetales, césped, maíz, maní	Sc
Pyralidae	Gusanos tela	Suelo, Césped	Frambuesa, Ornamentales, césped	Sc
Ortóptera				
Gryllotalpidae	Grillos	Suelo, Césped	Vegetales, césped	Ss, Sr
Siphonaptera				
Pulcidae	Pulgas	Suelo, Césped	Mascotas	Sc

Sc= *S. carpocapsae*; Sf= *S. feltiae*; Sr= *S. riobrave*; Ss= *S. scapterisci*; Hb= *H.**bacteriophora*; Hm= *H. megidis*.**Fuente:** (Hazir *et al.*, 2003)

Las investigaciones con NEPs requiere, como metodología inicial, la caracterización de las colectas de NEPs que se obtengan de las diferentes regiones con el fin de identificar cepas más efectivas y cuya persistencia sea mayor al momento de introducirlas en diferentes condiciones ambientales (Shapiro-Ilan *et al.*, 2012).

Su producción se realiza *in vivo*, sobre larvas de insectos, específicamente en *Galleria mellonella* porque son muy susceptibles (Woodring & Kaya, 1988) o *in vitro*, en medios sólidos o líquidos (Bedding, 1984). Diversas compañías dedicadas a producción de bioinsumos en Europa, Asia y Norte América producen en masa nematodos ya sea a pequeña escala *in vivo* o a gran escala *in vitro* utilizando biorreactores (Shapiro-Ilan & Gaugler, 2002) que permiten producir volúmenes de hasta 80.000 litros (Ehlers, 2005) para comercializarlos como bioplaguicidas.

1.4.1.2 Ciclo de vida

El ciclo de vida de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis* consta de una etapa de huevo, cuatro estados juveniles (J1 a J4) y un estado adulto (Sáenz, 2005). El único estado que no se alimenta y que puede infectar y matar al insecto se conoce como infectivo juvenil (IJ o J3) y esta morfológica y fisiológicamente adaptado para vivir en el suelo por largos periodos de tiempo hasta encontrar un nuevo huésped (Castillo *et al.*, 2011; Vasquez, 2012).

El nematodo ingresa dentro del cuerpo del insecto, específicamente en el hemocele, a través de aberturas naturales como, boca, ano y espiráculos (figura 1) o por áreas delgadas de la cutícula (en heterorhabditidos) (Poinar & Grewal, 2012; Chitra *et al.*, 2017). Una vez que se encuentran en el interior del hemocele, el nematodo descarga su bacteria simbiote y el insecto muere dentro de 24 – 48 horas por un proceso denominado septicemia (Kaya & Gaugler, 1993; Grewal & Georgis, 1998).

Las bacterias simbióticas se multiplican dentro del huésped y liberan complejos de toxinas, enzimas hidrolíticas, hemolisinas y compuestos antimicrobianos (Eleftherianos *et al.*, 2010) que impiden la incursión de microorganismos oportunistas. Además,

promueven la descomposición del insecto y proporcionan un ambiente adecuado para el desarrollo y reproducción de una a tres generaciones de nematodos en el cadáver del insecto (Kaya & Gaugler, 1993; Hazir *et al.*, 2004).

Los NEPs se alimentan del tejido degradado del insecto y de las bacterias, pasan al estado adulto y se reproducen. Una vez que los nutrientes se agotan el nematodo llega nuevamente al estado J3 o IJ, vuelve a incorporar su bacteria simbiote dentro de su intestino, sale del insecto y va en búsqueda de un nuevo huésped (Adams & Nguyen, 2002).

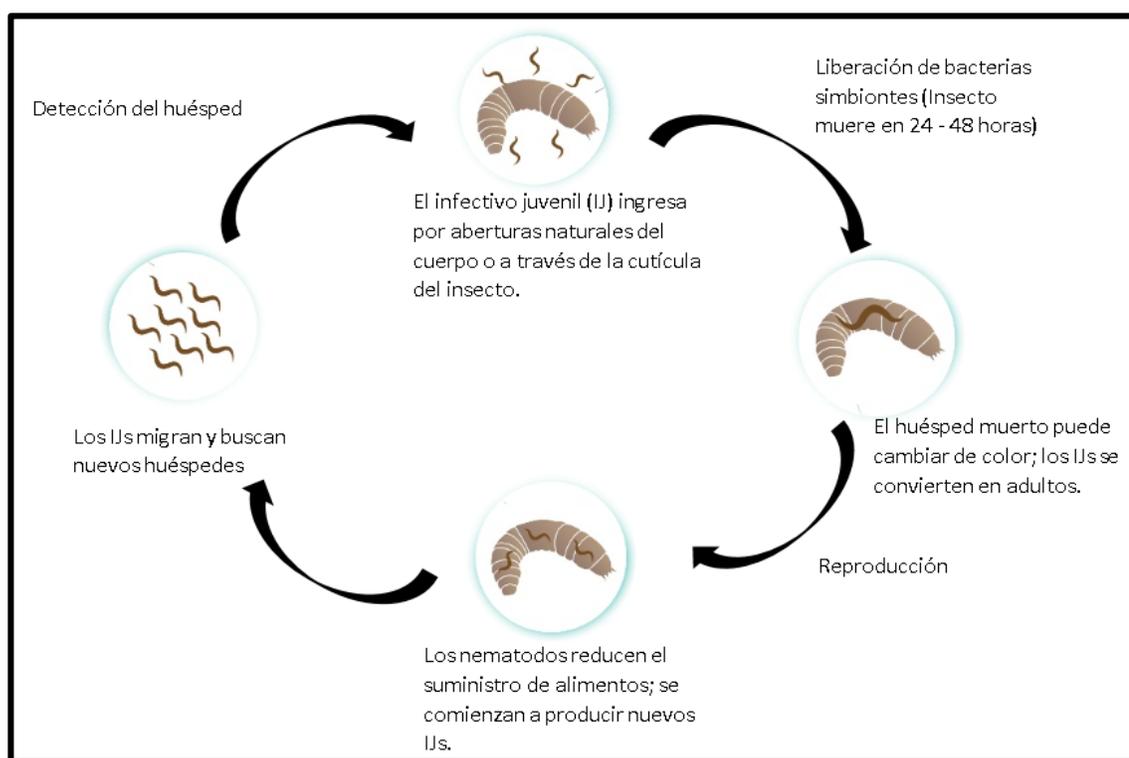


Figura 1. Ciclo de vida de los nematodos entomopatógenos

Fuente: (Grewal & Georgis, 1998)

1.4.1.3 Simbiosis nematodo-bacteria

Los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis* se caracterizan por sus asociaciones simbióticas con bacterias del género *Xenorhabdus* spp. y *Photorhabdus* spp.,

respectivamente (Shapiro-Ilan & Gaugler, 2002). Estas bacterias pertenecen a la familia Enterobacteriaceae y no presentan estadios resistentes ni se encuentran libres en la naturaleza, sino solamente en los nematodos o insectos huéspedes (Koppenhofer, 2007). Se caracterizan por ser gram negativas, anaerobias facultativas y con forma bacilar (Sáenz, 2005). La diferencia más predominante entre ambos géneros de bacterias es la luminiscencia que emite *Photorhabdus* spp, mientras que *Xenorhabdus* spp no son luminiscentes (Sáenz, 2005).

De esta asociación simbiótica, tanto el nematodo como la bacteria se benefician mutuamente. La bacteria no puede sobrevivir en el suelo, por consiguiente necesita del juvenil infectivo donde su hogar es el intestino, asimismo recibe la protección del nematodo ya que éste inhibe las defensas antibacterianas del insecto huésped (Castillo *et al.*, 2011; Sáenz, 2005).

Por otro lado, los nematodos reciben los beneficios de la bacteria, debido a que éstas matan al insecto por septicemia y crean un ambiente adecuado para la multiplicación y reproducción del nematodo al impedir la invasión de microorganismos oportunistas a través de la producción de antibióticos, asimismo la bacteria degrada los tejidos del hospedero y lo convierten en una fuente de comida para el nematodo y a su vez la bacteria también sirve como fuente de alimento para el nematodo (Moazami, 2002; Dillman & Sternberg, 2012; Lacey *et al.*, 2001). Los nematodos son incapaces de reproducirse sin la existencia de la bacteria simbiótica en el cadáver del insecto (Shapiro-Ilan & Gaugler, 2002; Sáenz, 2005).

1.4.1.4 Diferencias entre el género *Steinernema* y *Heterorhabditis*

A pesar de las similitudes en cuanto a su modo de infección, ciclo de vida y su relación simbiote con bacterias específicas, existen ciertas características que diferencian a ambos géneros. En la tabla 2 se citan las diferencias en base a los estudios realizados por Koppenhofer (2007), Wouts (1991), Martens *et al.* (2003), Morton (2009), Poinar (1990), Ciche & Ensing (2003), Chitra *et al.* (2017) y Dix *et al.* (1992).

Tabla 2Diferencias entre el género *Steinernema* y *Heterorhabditis*

Género <i>Steinernema</i>	Género <i>Heterorhabditis</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Se asocian de forma simbiótica con bacterias del género <i>Xenorhabdus</i>, que guardan en una porción ventricular de su intestino. 	<ul style="list-style-type: none"> • Se asocian de forma simbiótica con bacterias del género <i>Photorhabdus</i> que guardan a lo largo de todo su intestino.
<ul style="list-style-type: none"> • Ingresan en el huésped a través de boca, ano y espiráculos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Ingresan en el huésped a través de boca, ano, espiráculos y también por regiones delgadas de la cutícula debido a que presentan un diente dorsal.
<ul style="list-style-type: none"> • Liberan las bacterias por el ano del cuando realiza la infección en el huésped. 	<ul style="list-style-type: none"> • Liberan las bacterias por la boca cuando realiza la infección en el huésped.
<ul style="list-style-type: none"> • Los cadáveres infectados por este género se observan ligeramente hinchados, de coloración amarillo cremoso (figura 2A). 	<ul style="list-style-type: none"> • los cadáveres infectados presentan una coloración café rojiza (figura 2B).
<ul style="list-style-type: none"> • Los cadáveres de los huéspedes infectados por este género no presentan bioluminiscencia. 	<ul style="list-style-type: none"> • Los cadáveres de los huéspedes infectados por este género presentan bioluminiscencia producida por la bacteria simbiote.
<ul style="list-style-type: none"> • Son sexuales (excepto <i>Steinernema hermaphroditum</i>), por ende requieren de un infectivo juvenil hembra y macho para producir progenie. 	<ul style="list-style-type: none"> • Son hermafroditas, es decir, se requiere un solo infectivo juvenil para producir progenie.
<ul style="list-style-type: none"> • El tiempo de ciclo de vida (desde la infección hasta la salida de los IJs) es de 7-10 días. 	<ul style="list-style-type: none"> • El tiempo del ciclo de vida (desde la infección hasta la salida de los IJs) es de 12-15 días.

Las coloraciones producidas en el insecto huésped por la infección de cada género se debe a los antibióticos producidos por su bacteria simbiote (Morton, 2009). En la figura 2 se presentan las coloraciones que presenta el cadáver del insecto huésped, en este caso *Galleria mellonella*, cuando se encuentra infectado por especies de ambos géneros.

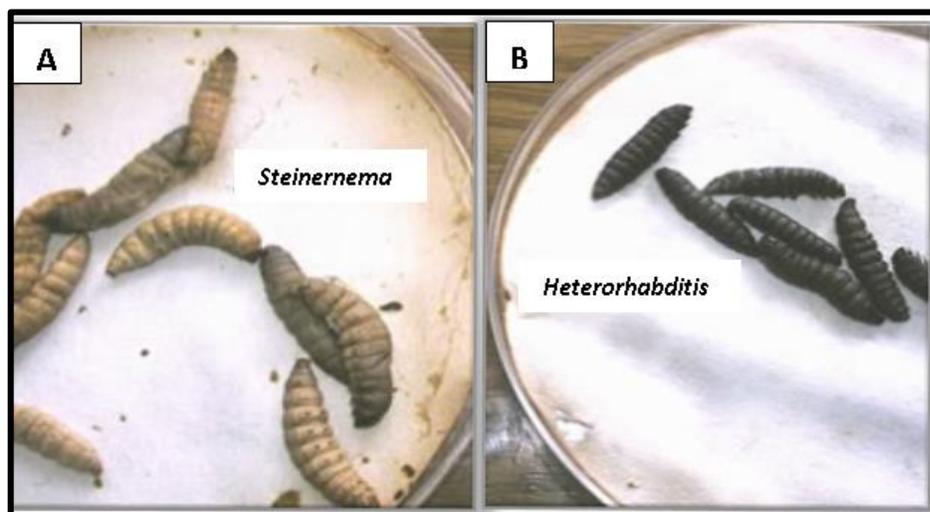


Figura 2. Larvas de *Galleria mellonella* infectadas por nematodos entomopatógenos

Fuente: (Shahina et al., 2004)

Nota: **A)** larvas infectadas por nematodos del género *Steinernema*; **B)** larvas infectadas por nematodos del género *Heterorhabditis*.

1.4.2 Taxonomía

A lo largo de todos estos años se han realizado investigaciones que han permitido elaborar clados o árboles taxonómicos de nematodos entomopatógenos (NEPs). En 1923, Steiner describió el primer NEP, *Aplectana Kraussei*, mismo que fue aislado de la mosca, *Cephaleia abietis* por el Dr. Krausse. En 1927, Travassos, quien trabajaba en Brasil, transfirió la especie a su nuevo género *Steineria*, nominando a la antigua *A. Kraussei* como especie tipo; no obstante, de acuerdo con las reglas de la nomenclatura zoológica de ese año, se requería un nuevo nombre para la especie y es así que Travassos, al darse cuenta de su error, propuso inmediatamente el nombre genérico de *Steinernema*. Dos años más tarde (1929), Steiner describió otro género y especie, *Neoplectana glaseri*, (aislado de larvas del escarabajo japonés, *Popilia japónica*) cuyas características eran muy similares a *Steinernema Kraussei*. Filipjev en 1934 ubicó a *Neoplectana* y *Steinernema* en una nueva subfamilia a la que denominó Steinernematinae; los estudios realizados determinaron que *Neoplectana* tenía probablemente el mismo origen con *Steinernema*; sin embargo en 1937, Chitwood y Chitwood elevaron a la subfamilia Steinernematinae a

la familia Steinernematidae. Posteriormente, en los estudios de Wouts *et al.* (1982) se revisaron las descripciones de *Steinernema* y *Neoplectana* y concluyeron que ambos géneros eran idénticos y que *Neoplectana* era un sinónimo de *Steinernema*. En 1994, Nguyen y Smart describieron un nuevo género al que denominaron *Neosteinernema* y basándose en los resultados obtenidos de la descripción, añadieron a este nuevo género a la familia Steinernematidae.

La familia Heterorhabditidae y el género *Heterorhabditis* en cambio, tuvo su origen en 1976, cuando Poinar describió la especie *Heterorhabditis bacteriophora*, y observó las diferencias que existen con el género *Steinernema*.

A pesar de todos estos estudios realizados, aun se creía que los steinernematidos y heterorhabditidos estaban estrechamente relacionados dentro del orden Rhabditida debido a que ambos géneros comparten muchas similitudes en cuanto a su morfología, ciclos de vida y su relación simbiote con bacterias específicas (Adams *et al.*, 2007). Sin embargo, Poinar (1993) en estudios de comparación morfológica, destacó grandes diferencias entre los dos géneros y llegó a concluir de que las dos familias eran polifiléticas en origen, que las similitudes eran atribuibles a una evolución convergente, además que los heterorhabditidos eran probablemente de origen marino. Blaxter *et al.* (1998), mediante análisis moleculares, concluyó que el género *Steinernema* se encuentra asociado al clado strongyloidida.

En la actualidad se han detectado 30 familias de NEPs que infectan insectos; sin embargo, debido a su potencial como biocontroladores, la búsqueda se ha concentrado en 7 familias: Mermithidae, Allantonematidae, Neotylenchidae, Rhabditidae, Sphaerularidae, Steinernematidae y Heterorhabditidae, siendo las dos últimas las de mayor interés por las ventajas que muestran como controladores biológicos (Lacey *et al.*, 2001).

El género *Steinernema* cuenta con más de 60 especies siendo las más comunes *S. carpocapsae* y *S. feltiae*, en cambio el género *Heterorhabditis* presenta más de 20 especies reconocidas siendo la más común *H. bacteriophora* (Campos-Herrera *et al.*, 2012). La

taxonomía propuesta actualmente se basa en la revisión de Stock & Hunt (2005) y Hunt (2007).

Reino:	Animalia
Filum:	Nematoda
Clase:	Chromadorea
Subclase:	Rhabditia
Orden:	Rhabditida
Superfamilia:	Strongyloidoidea
Familia:	Steinernematidae
Género:	<i>Steinernema</i>
Familia:	Heterorhabditidae
Género:	<i>Heterorhabditis</i>

1.4.3 Morfología

Las especies de steinernematidos y heterorhabditidos presentan similares ciclos de vida así como métodos de infección parecidos; sin embargo; existen características morfológicas que permiten la diferenciación entre género y entre especies. Para la caracterización generalmente se toman especímenes de cada estadio (infectivos juveniles y adultos de primera y segunda generación) para observar la variación morfológica en la misma especie cuando pasa de un estadio a otro (Negrete, 2013).

1.4.3.1 Morfología general del género *Steinernema*

La descripción general de la morfología del género *Steinernema*, por estadios, se presentan en la figura 3 en base a estudios realizados por Nguyen & Smart (1996).

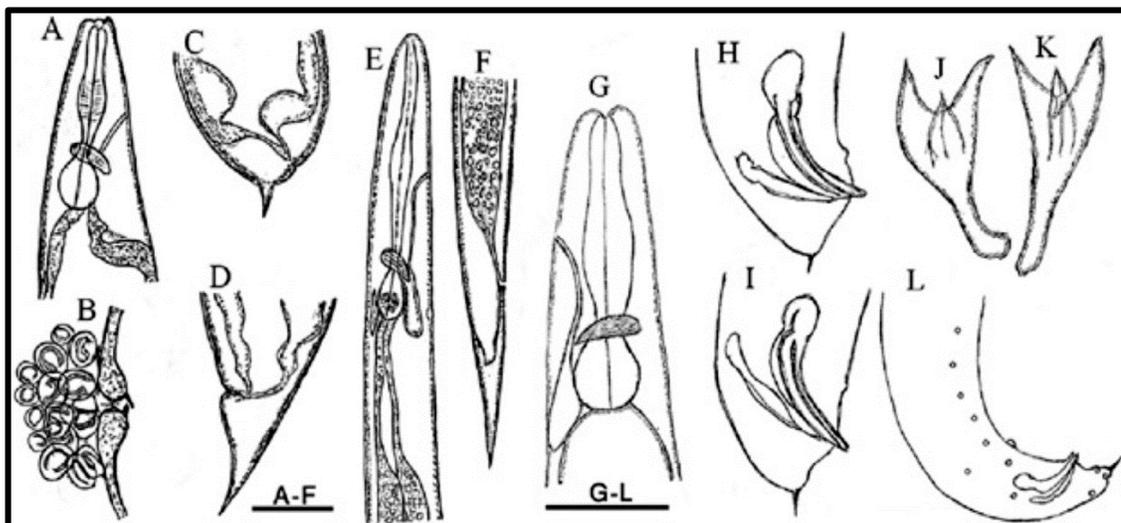


Figura 3. Diagramas para la identificación del género *Steinernema*

Fuente: (Nikdel & Niknam, 2015)

Nota: **A-C**, Hembras de primera generación: **A**, región de la cabeza y poro excretor; **B**, vulva; **C**, vista lateral de la cola; **D**, cola de la hembra de segunda generación; **E**, región anterior del IJ; **F**, región posterior del IJ. **G-L**, machos de primera generación; **G**, región anterior; **H** e **I**, región posterior, espículas, gubernáculo y mucrón; **J** y **K**, gubernáculo; **L**, región posterior del macho muestra papilas genitales y mucrón.

Hembras: Son de tamaño variable; cutícula anillada o lisa; campos laterales ausentes; poro excretor visible (figura 3A); la cabeza es redondeada o trunca (figura 3A y 3E); presentan 6 labios con su respectiva papila labial; poseen 4 papilas cefálicas; poseen pequeños anfidios; la vulva se encuentra localizada en la mitad del cuerpo (figura 3B); la cola es más larga o más corta que el ancho del cuerpo a nivel del ano (figura 3C y 3D) (Nguyen & Smart, 1996).

Machos: Son de tamaño más pequeño que las hembras; cabeza con 6 papilas labiales y 4 papilas cefálicas; espículas pareadas y separadas (figura 3H y 3I); el gubernáculo es largo (figura 3I y 3J); está desprovisto de bursa; la cola tiene una terminación redondeada, digitada o mucronada (figura 3I); presenta de 10 a 14 papilas genitales con 7 a 10 pares de papilas precloacales (figura 3L) (Nguyen & Smart, 1996).

Infectivos juveniles (IJ o J3): Presentan boca y ano cerrados; cuerpo delgado y alargado (figura 3E), con o sin una envoltura (cutícula del segundo estadio juvenil); la cutícula es anulada; se puede observar el poro excretor (figura 3E); campos laterales presentes con 4 a 9 surcos y de 3 a 8 protuberancias lisas; la cola puede ser conoide o filiforme (figura 3F) (Nguyen & Smart, 1996).

1.4.3.2 Morfología general del género *Heterorhabditis*

Las características generales de cada estadio del género *Heterorhabditis* se presentan en la figura 4 en base a estudios realizados por Nguyen & Smart (1996).

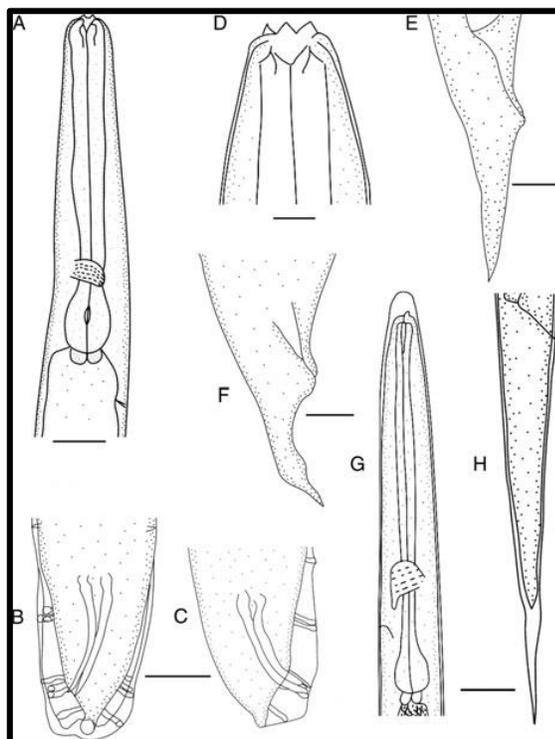


Figura 4. Diagramas para la identificación del género *Heterorhabditis*

Fuente: (Malan *et al.*, 2014)

Nota: **A-C**, Machos: **A**, región anterior; **B-C**, vista ventral y lateral de la cola mostrando espículas y papilas genitales; **D-F**, Hermafrodita: **D**, región de la cabeza; **E-F**, variación en la cola; **G-H**, Juvenil infeccioso de tercera etapa: **G**, región anterior; **H**, región de la cola.

Hembras hermafroditas: Presentan la cabeza truncada o ligeramente redondeada; presentan seis labios cónicos bastante desarrollados (figura 4D), cada uno separado con una papila terminal; tienen una pequeña abertura anfídial; poro excretor visible; vulva localizada en la mitad del cuerpo, con forma de hendidura; la cola es punteaguda, más larga que el ancho del cuerpo a nivel del ano y generalmente presentan un abultamiento post-anal (figura 4F y 4E) (Nguyen & Smart, 1996).

Hembras anfimíticas: Similar a la hembra hermafrodita solo que más pequeña; las papilas labiales son prominentes; la vulva no es funcional para la puesta de huevos, pero si es funcional para aparearse (Nguyen & Smart, 1996).

Machos: Presenta una cabeza truncada ligeramente redondeada (figura 4A); tienen espículas pareadas, separadas y ligeramente curvadas ventralmente; la cabeza de la espícula es corta; el gubernáculo es largo y delgado; la bursa presenta 9 pares de papilas genitales (figura 4B y 4C) (Nguyen & Smart, 1996).

Infectivos juveniles (IJ o J3): Se encuentra envuelto con la cutícula del segundo estadio juvenil (figura 4G y 4H); la envoltura presenta una forma estriada mientras que la del tercer estadio presenta un patrón longitudinal; la cabeza presenta dientes dorsales prominentes; el poro excretor es visible; las bacterias simbióticas pueden observarse en el intestino; la cola termina en punta (figura 4H) (Nguyen & Smart, 1996).

1.4.4 Aislamiento, multiplicación y almacenamiento de NEPs

La detección de NEPs se realiza tomando muestras de suelo en el que exista presencia de insectos infectados por estos nematodos. Para su aislamiento se utilizan trampas White o insectos trampa. Los nematodos obtenidos deben pasar por los postulados de Koch para comprobar si poseen patogenicidad hacia los insectos (Castillo *et al.*, 2011).

Una vez recuperados del suelo se multiplican *in vivo* utilizando un insecto hospedero como *Galleria mellonella* (Lepidóptera: Pyralidae), debido a que es altamente susceptible al ataque de los NEPs (Woodring & Kaya, 1988; Urbano, 2003). Se obtienen

hasta 200.000 infectivos juveniles (IJs) de nematodos por larva de *G. mellonella* (Kaya, 1993).

Los IJs que se obtengan se almacenan en agua destilada con bicarbonato de sodio al 1% para evitar que se peguen entre sí por sus excrementos. En caso de que no exista una buena aireación en los recipientes, solo pueden concentrarse de 10000 - 20000 nematodos/ml con una altura de agua menor a 1 cm (Fernandez *et al.*, 2017).

Las especies del género *Steinernema* pueden almacenarse a temperaturas de 4 a 10°C, de esta manera se asegura que mantengan su actividad de 6 a 12 meses (Castillo *et al.*, 2011), pero los heterorhabditidos sólo pueden llegar a 2-4 meses con la misma temperatura, por tanto es necesario realizar la renovación transcurrido este tiempo para evitar pérdida de las especies (Fernandez *et al.*, 2017).

1.4.5 Identificación de los nematodos entomopatógenos (NEPs)

La identificación de género y especies nematodos se realiza tradicionalmente por métodos morfológicos, sin embargo, en la actualidad esta metodología se complementa con las herramientas moleculares (Stock, 2002).

1.4.5.1 Identificación morfológica

La descripción de especies de nematodos se efectúa tradicionalmente mediante el análisis de caracteres morfológicos y morfométricos, y su identificación se basa principalmente en comparaciones con claves taxonómicas (Nguyen & Smart, 1996). A medida que se descubren nuevas especies, estas metodologías presentan dificultad para discriminar una especie de otra, ya que existen similitudes morfológicas entre ellas (Poinar, 1990). Los intentos de superar estas dificultades dieron lugar a la creación de una serie de relaciones adicionales (tabla 3) a las habituales que de alguna manera permiten una identificación más exacta de la especie que se esté analizando (Hunt, 2007a).

Tabla 3

Principales caracteres morfológicos de nematodos entomopatógenos (NEPs)

Característica
Longitud del cuerpo (L)
a (L/W)
b (L/ES)
c (L/T)
Diámetro del cuerpo (W)
Poros excretor (EP)
Anillo nervioso
Longitud de esófago (ES)
Longitud de la cola (T)
Diámetro del cuerpo anal (ABD)
Longitud del mucrón
Longitud de la espícula (SL)
Ancho de la espícula (SW)
*D% [(EP/ES) x 100]
*E% [(EP/T) x 100]
*SW (SL/ABD) x 100)
*GS (GL/SL) x 100)

*Relaciones adicionales.

Fuente: (Nikdel & Niknam, 2015)

Muchos nematodos son pequeños, por lo que un microscopio es una herramienta indispensable para realizar una buena caracterización (Van Bezooijen, 2006). Los caracteres morfo-anatómicos se estudian utilizando un microscopio de luz (LM), microscopio electrónico de barrido (MEB) y microscopio de transmisión electrónica (TEM) (Siddiqi, 2000). La visualización de estructuras con la alta resolución alcanzada usando los microscopios electrónicos proporciona la base para desarrollar conclusiones válidas sobre relaciones funcionales (Fischer *et al.*, 2013).

El MEB es esencial para la interpretación de estructuras que no pueden ser apreciadas con un LM, y que son importantes para la taxonomía (Hominick *et al.*, 1997). Entre las ventajas se destaca la alta resolución de sus imágenes y la capacidad de producir una magnificación potente de hasta 50.000 X (Hooper, 1988), permitiendo la observación y caracterización de materiales sólidos como, cerámicos, polímeros, madera, metales,

biológicos, entre otros (Zhou *et al.*, 2007). Su funcionamiento consiste principalmente en la utilización de un haz enfocado de electrones de alta energía que genera una variedad de señales en la superficie de muestras sólidas (Van Bezooijen, 2006). Las imágenes que se obtienen de las interacciones electrón-muestra revelan información sobre la muestra incluyendo morfología externa; es decir, textura, tamaño, forma, composición química y estructura cristalina (Zhou *et al.*, 2007).

El proceso más común para la preparación de muestras biológicas implica la fijación, post-fijación, deshidratación, secado y metalizado ya que estos pasos permiten la conservación morfológica de las muestras, sin embargo este protocolo no puede considerarse como estándar ya que, dependiendo del tipo de muestra, algunos de los químicos producen deformaciones haciendo que varíen mucho en la calidad de las micrografías (Eisenback, 1991).

Para obtener buenos resultados con el MEB, es importante seguir el mismo protocolo de trabajos publicados para una muestra en particular; sin embargo la mayoría de las veces, el mismo investigador es quien termina estandarizando su propio protocolo tomando como referencia los criterios generales que se citan en los artículos para establecer la manera más adecuada para manipular y procesar su muestra (Nieto, 2010).

En algunos grupos de nematodos, la separación de géneros y/o especies depende de las características morfológicas que se ven claramente con MEB y muchas otras características son mucho más fáciles de interpretar con microscopía de luz (Hooper, 1988). Para nematodos entomopatógenos, el MEB se utiliza para la visualización de estructuras tales como: anfidios, disposición de las bandas del campo lateral y forma de la cola de los infectivos juveniles; papilas cefálicas, labiales y estructura de la cola de los individuos machos y hembras; forma de la espícula, disposición y número de papilas genitales, presencia o ausencia de mucrón cuticular en el extremo de la cola en los especímenes machos (Vásquez, 2012).

1.4.5.2 Identificación molecular

La identificación de especies de nematodos entomopatógenos (NEPs) se basa tradicionalmente en características morfológicas y morfométricas. Hoy en día, debido al creciente número de especies y dificultad en la interpretación de características morfológicas, se utilizan herramientas moleculares como métodos complementarios (Vasquez, 2012).

La identificación molecular y genotipado de NEPs son prerequisites indispensables para realizar estudios de biodiversidad, evolución y su uso potencial en programas de control biológico (Kaushik & Chaubey, 2016). El poder discriminatorio de las herramientas moleculares se ha convertido en el método de elección principal para el diagnóstico de estos organismos en una manera objetiva, rápida y repetible (Joyce *et al.*, 1994; Reid & Hominick, 1992; Stock, 2002; Campos-Herrera *et al.*, 2012).

La extracción del material genético, Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y la secuenciación son actividades importantes al momento de efectuar estudios taxonómicos y genéticos de nematodos (Stock, 2002; Hominick *et al.*, 1997). La extracción de ADN es una técnica sencilla (Stock, 2002) que consta de una etapa de lisis en la cual se rompe las estructuras celulares y se libera el material genético contenido en ellas para su posterior análisis (Catasús & Matías-Gulu, 1997). La PCR es una técnica de investigación muy utilizada para hacer copias de un gen particular del ADN extraído. En la figura 5 se puede observar que la amplificación se realiza mediante ciclos de desnaturalización, acoplamiento de *primers*, y extensión de las cadenas por la acción de la enzima ADN polimerasa (Catasús & Matías-Gulu, 1997).

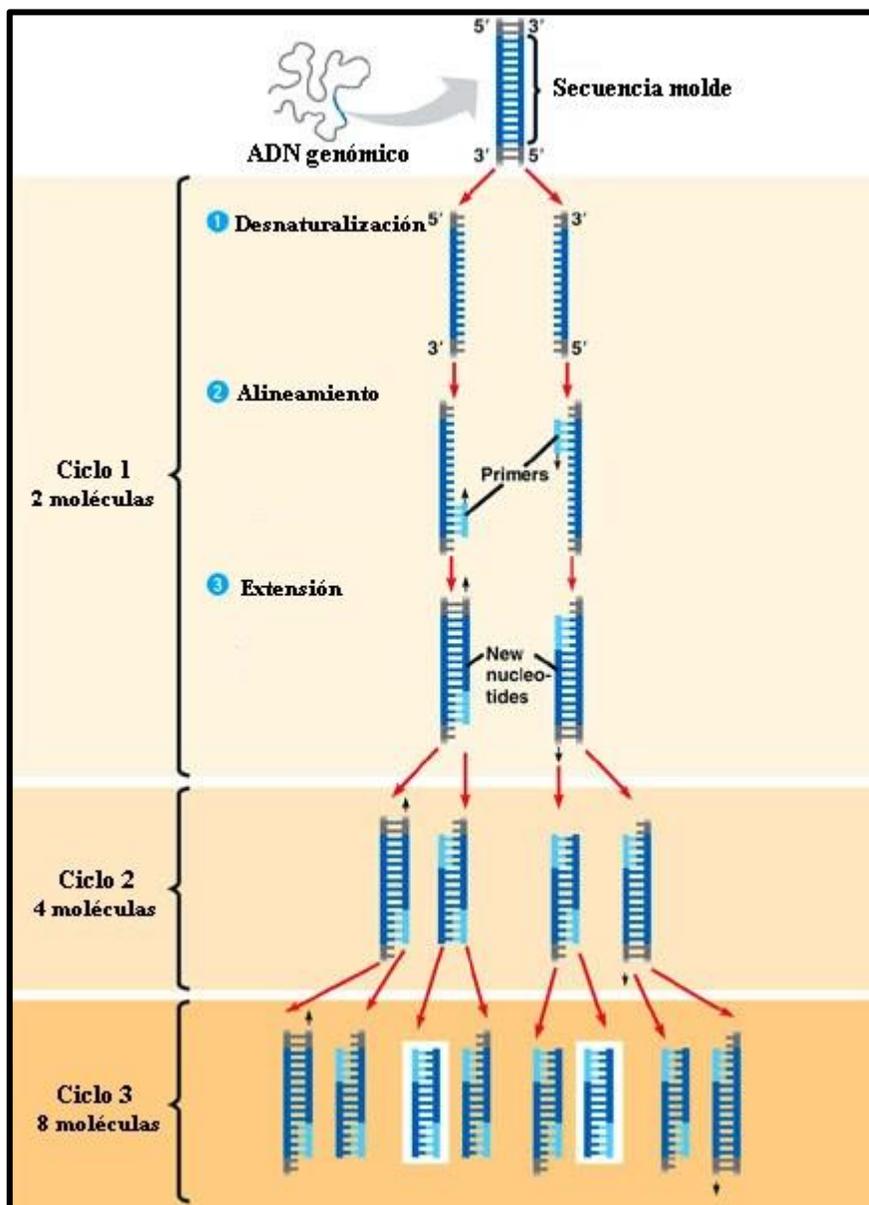


Figura 5. Proceso de amplificación de ADN por técnica PCR

Fuente: (Catasús & Matías-Gulu, 1997)

La secuenciación es una técnica que permite determinar el orden de nucleótidos en una muestra de material genético. Los datos obtenidos mediante este proceso ayuda a obtener información acerca de la variación dentro y entre las especies y realizar una evaluación eficaz de las relaciones filogenéticas a diferentes niveles taxonómicos (Stock, 2002).

En la actualidad, para clasificar a los nematodos en diferentes niveles taxonómicos se analizan tres genes del ADNr nuclear las cuales son: la region18S o subunidad pequeña (SSU), el espaciador interno transcrito (ITS-5.8S-ITS2) y la región 28S o subunidad grande (LSU). El gen 18S del ADNr o SSU ha demostrado ser altamente conservado en la resolución de las relaciones entre *Heterorhabditis* y *Steinernema* (Liu *et al.*, 1997; Stock *et al.*, 2001). La región ITS (ITS-5.8S-ITS2) también es altamente conservada en muchas especies de nematodos y se utiliza para realizar reconstrucciones filogenéticas e identificar especies (Lephot, 2013). Esta región proporciona información sobre el polimorfismo específico de especie y en algunos casos polimorfismo específico de poblaciones (Powers *et al.*, 1997). El marcador LSU también se ha investigado para evaluar las relaciones filogenéticas entre especies del género *Steinernema* (Stock *et al.*, 2001). Esta región es considerada eficaz y fiable, tanto para la delimitación de taxones terminales en *Steinernema*, como para fines de diagnóstico (Stock *et al.*, 2001; Stock & Hunt, 2005). En la figura 6 se observa la distribución de las tres regiones dentro del ADNr nuclear empleadas para la clasificación de los NEPs.

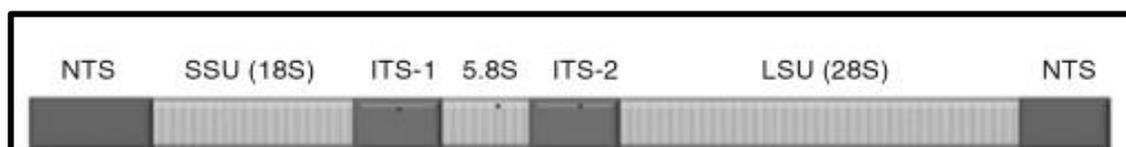


Figura 6. Representación esquemática de los genes ribosomales de los nematodos entomopatógenos.

Fuente: (Stock, 2009)

1.5 Hipótesis de la investigación

- La amplificación de las regiones D2D3 e ITS permiten la detección de nematodos entomopatógenos.
- La técnica de microscopía electrónica de barrido permite identificar morfológicamente especies de nematodos entomopatógenos de cada aislamiento.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Participantes

El proyecto de titulación fue desarrollado por Byron Patricio Pallo Alomoto, con el respaldo del Ing. Pablo Llumiyinga en calidad de tutor del proyecto, la Lcda. Katerine Orbe, responsable del DNPV de la Estación Experimental Santa Catalina –INIAP, el Dr. Carlos Arroyo y la Ing. Karla Vizuite como responsable y técnico respectivamente del Laboratorio de Caracterización de Nanomateriales, y Dra. Karina Proaño como Directora de tesis.

2.2 Zona de estudio

Los ensayos de renovación e infección de *Galleria mellonella* con infectivos juveniles (IJs) para la obtención del material en estudio (IJs y adultos) se realizó en los laboratorios de Nematología del DNPV; mientras que, los ensayos moleculares se llevaron a cabo en el Departamento Nacional de Biotecnología (DNB) de la Estación Experimental Santa Catalina (EESC). Los análisis por microscopía electrónica de barrido se realizaron en el laboratorio de Caracterización de Nanomateriales de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

2.3 Metodología

2.3.1 Renovación de los aislamientos almacenados

La renovación de cada aislamiento se realizó siguiendo la metodología propuesta por Kaya & Stock (1997) y Castillo *et al.* (2011) tal como se aprecia en la figura 7. Se colocó 1 mL de suspensión de IJs (200 nematodos/mililitro aproximadamente) sobre un papel filtro Whatman No.1 de 9 cm de diámetro dispuesto dentro de una caja Petri (Figura 7A). Sobre el papel filtro, se colocaron 10 larvas de *G. mellonella* para mantener una

proporción de 20 nematodos/larva. Las cajas Petri se incubaron a 25⁰C durante 10 días. Transcurrido este tiempo, los cadáveres de larvas se depositaron en trampas White (figura 7B) y se almacenaron nuevamente en la incubadora a 25⁰C por 4 días más hasta que los nuevos IJs salgan de los cadáveres y queden atrapados en la trampa White. Los IJs se colectaron y se traspasaron a recipientes con agua destilada para lavarlos (figura 7C).

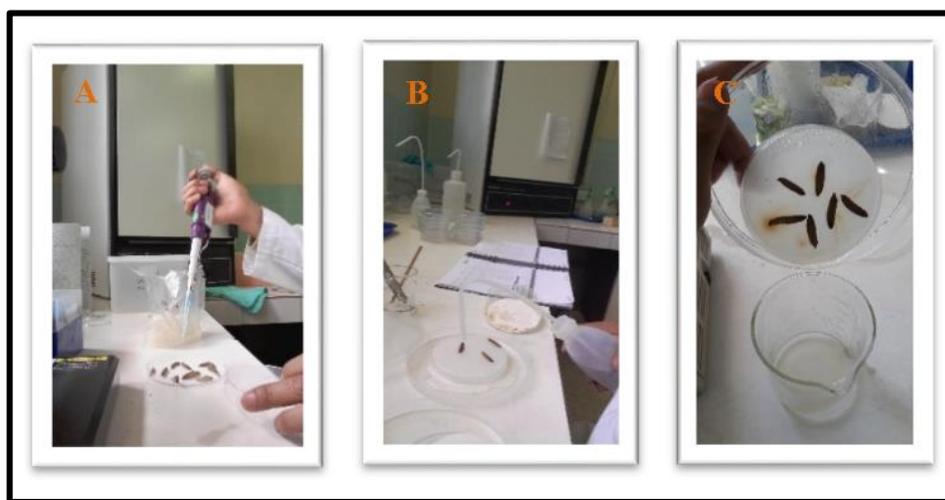


Figura 7. Renovación de los aislamientos

Nota: **A)** Infección de *G. mellonella* con IJs, **B)** Colocación de larvas muertas en trampas White, **C)** Cosecha de los nuevos IJs.

Los recipientes se colocaron en forma inclinada por 20 minutos hasta que los nematodos decanten. El proceso de lavado se repitió por tres veces cambiando el agua y se almacenó en cajas Petri de 15 cm de diámetro con 30 mL de agua destilada con aproximadamente 16500 IJs y en fundas plásticas en la que contenían tiras de esponja y 120 mL de agua destilada con aproximadamente 68000 IJs. Finalmente, tanto las cajas Petri como las fundas con nematodos se colocaron en refrigeración a una temperatura de 10⁰C. La información de los aislamientos seleccionados de la colección de la EESC se muestra en el anexo A.

2.3.2 Obtención de especímenes

Las muestras de infectivos juveniles se obtuvieron de los aislamientos que se renovaron. En cambio, para obtener especímenes adultos, se realizó la infección de larvas de *G. mellonella* con los nematodos entomopatógenos (NEPs) renovados siguiendo la metodología descrita en el apartado 2.3.1, tal como se aprecia en la figura 8. Sin embargo los especímenes adultos de primera y segunda generación se obtuvieron disectando las larvas infectadas en solución Ringer (figura 8A, 8B y 8C) a los 3 y 8 días respectivamente bajo el estereomicroscopio Olympus SZ40 (Ivanova *et al.*, 2013).

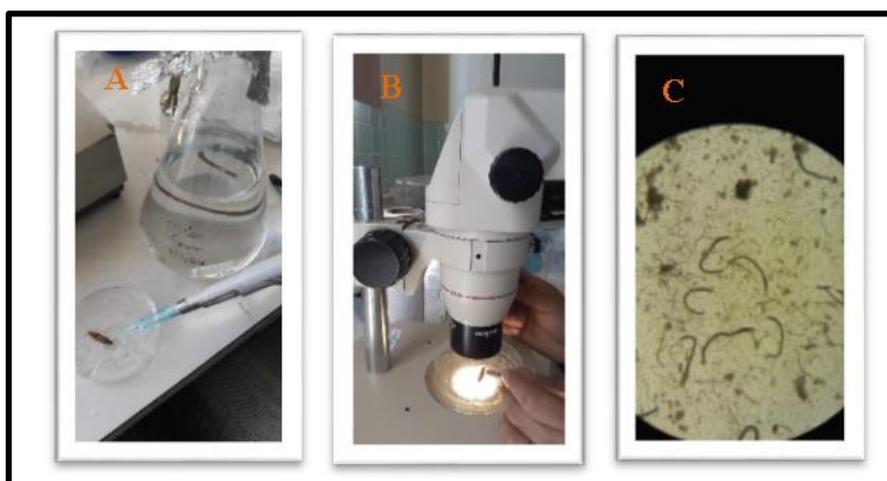


Figura 8. Obtención de especímenes adultos

Nota: **A)** Infección con NEPs renovados en larvas de *G. mellonella*, **B)** Disección de larvas de *G. mellonella*, **C)** Colecta de NEPs en fase adulta.

2.3.3 Análisis moleculares

Para la identificación molecular se utilizó un espécimen hembra de primera generación de cada aislamiento, el mismo que se obtuvo tres días después de la inoculación mediante disección de los cadáveres de *G. mellonella* en solución Ringer.

2.3.3.1 Extracción de ADN

La extracción se realizó siguiendo el método propuesto por Nguyen (2007) con modificaciones. Se cortó una hembra de primera generación con un bisturí en tres secciones en 5 μ L de agua ultrapura. Se transfirieron los cortes del nematodo a un microtubo que contenía 18 μ L de MIX de Buffer (8 μ L de Buffer 10X + 10 μ L de agua doble destilada; ver anexo B) y se colocó en hielo. Después se añadió 2 μ L de proteinasa K (20 mg/ml) y luego se incubó en el termociclador a 65°C por una hora, seguido por 95°C por 10 minutos para completar la lisis celular, digestar proteínas e inactivar la proteinasa K. Posteriormente el tubo se centrifugó a 12000 rpm por dos minutos y se almacenó a -20°C.

2.3.3.2 Amplificación de fragmentos por PCR

La amplificación de las regiones 28S (segmento de expansión D2/D3) e ITS (ITS1-5.8S-ITS2) del ADNr nuclear se realizó con dos pares de *primers* distintos (figura 9).

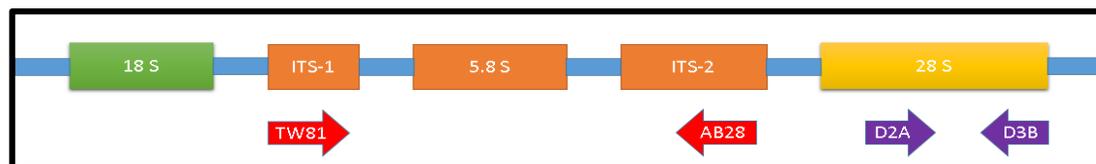


Figura 9. Regiones del ADNr que se amplificaron junto con el par de *primers*.

La región D2/D3 se amplificó con los *primers* universales *forward* D2A (5'-ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG-3') y *reverse* D3B (5'-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3'), para lo cual se siguió el protocolo de Gutiérrez-Gutiérrez *et al.* (2011) con modificaciones. La reacción se llevó a cabo a un volumen final de 50 μ L como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4

Concentraciones y volúmenes para PCR para amplificación de la región D2D3

Componentes			Volumen
Reacciones	Concentración inicial	Concentración final	1 X
<i>Primer D2A</i>	25 mM	0,6 uM	1,2µL
<i>Primer D3B</i>	25 mM	0,6 uM	1,2 µL
MgCl ₂	25 mM	2 mM	4 µL
dNTPs	5 mM	0,1 mM	1 µL
Buffer	10 X	1X	5 µL
Taq polimerasa (Invitrogen)	5 U/uL	1,5 U/uL	0,3 µL
ADN			2,5µL
H ₂ O			34,8µL

Las condiciones de PCR para la amplificación de las regiones se muestran en la tabla 5.

Tabla 5

Condiciones de PCR para la amplificación en el termociclador ABI Applied Biosystems A24811

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	3 min	1X
Desnaturalización	94°C	1min	
Hibridación	55°C	30 s	30X
Extensión	72°C	2 min	
Extensión final	72°C	7 min	1X

La región ITS del ADNr se amplificó siguiendo la metodología propuesta por Subbotin *et al.* (2000) con modificaciones, mediante el uso de *primers forward* TW81 (5'-GTTTCCGTAGGTGAACCTGC-3') y *reverse* AB28 (5'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3') y la reacción se llevó a cabo a un volumen final de 100 µL tal como se muestra en la tabla 6. La información detallada de los *primers* que se utilizaron para la identificación molecular se muestra en el anexo C.

Tabla 6

Concentraciones y volúmenes para PCR para amplificación de la región ITS

Componentes			Volumen
Reacciones	Concentración inicial	Concentración final	1 X
<i>Primer</i> TW81	10 uM	0,2 uM	2µL
<i>Primer</i> AB28	10 uM	0,2 uM	2 µL
MgCl ₂	50 mM	4 mM	8 µL
dNTPs	2 mM	0,2 mM	4 µL
Buffer	10 X	10X	10 µL
Taq polimerasa (Invitrogen)	5U/uL	5U/uL	1 µL
ADN			2µL
H ₂ O			71µL

Las condiciones de PCR para la amplificación de los fragmentos se realizó según lo sugerido por Subbotin *et al.* (2000) y se presentan en la tabla 7.

Tabla 7

Condiciones de PCR para la amplificación en el termociclador ABI Applied Biosystems A24811

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	4 min	1X
Desnaturalización	94°C	1min	
Hibridación	55°C	1,5min	35X
Extensión	72°C	2 min	
Extensión final	72°C	10 min	1X

2.3.3.3 Cuantificación de ADN

Para conocer la concentración en ng/uL del ADN extraído, se utilizó el equipo Epoch Microplate Spectrophotometer. Primero, se midió la muestra blanco (agua ultrapura Milli-Q) cargando 2 uL en los primeros pocillos de la placa del equipo. Luego

se midió 2 μ L de cada una de las muestras del ADN extraído. El software que se utilizó fue Gen 5 versión 2.07.

2.3.3.4 Análisis de productos en gel de agarosa

Una vez terminado el proceso de amplificación, se analizó el ADN mediante electroforesis horizontal a 100 V por 40 minutos. Se colocaron las muestras en gel de agarosa al 1,5% disuelto en tampón TAE 1X (tris 40 mM, acetato 20 mM, EDTA 1 mM) con 4 μ L de SYBR Green para la coloración del ADN. En cada pocillo se depositó 4 μ L de producto de PCR combinado con 3 μ L de Blue Juice. Se separaron las bandas de ADN y se observaron los resultados del gel bajo luz UV en un fotodocumentador marca Labnet ENDURO GDS Touch, Modelo GDST-1302. El marcador que se utilizó fue 1Kb Plus DNA Ladder (anexo D).

2.3.3.5 Análisis por secuenciación

Los productos obtenidos por PCR se purificaron y secuenciaron por el método de Sanger en Macrogen, (Seoul, South Korea) tomando en consideración los permisos del Ministerio de Ambiente bajo el Convenio Marco Institucional MAE-DNB-CM-2015-0024 denominado “Estudio De Caracterización, Bioecología Y Desarrollo De Componentes De Manejo Integrado De Cultivos Del Ecuador”. Los resultados de las secuencias obtenidas se editaron en el programa Chromas 2.6 (Technelysium, 2016) y BioEdit 7.2.5 (Hall, 1999) para obtener las secuencias consenso. Finalmente, las secuencias se compararon con la base de datos presentes en Genbank mediante el paquete bioinformático Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

2.3.3.6 Análisis filogenético

El análisis filogenético se realizó utilizando secuencias que mostraron un porcentaje alto de identidad de la base de datos del GenBank. Mediante el algoritmo Clustal W en el software MEGA7 se realizaron los alineamientos múltiples de las

secuencias. Los alineamientos se revisaron y las regiones ambiguas de las secuencias se excluyeron mediante el sitio online Gblocks. Finalmente, los árboles filogenéticos de la región ITS y de la región D2D3 se dedujo por separado, utilizando el método de Parsimonia Máxima (PM) (Saitou & Nei, 1987) para obtener un árbol de consenso usando el algoritmo subárbol-poda-regrafo (SPR) (Nei & Kumar, 2000). Los intervalos de confianza para los diferentes patrones de ramificación en los árboles se midieron con el test de bootstrap, con 1000 repeticiones (Felsenstein, 1985). Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA7 (Tamura *et al.*, 2013). Las especies *Caenorhabditis elegans* (FJ589008) y *Panagrellus redivivus* (AF331910) se utilizaron como taxón out-group durante la construcción de los árboles basados en las secuencias ITS y D2D3, sugeridos por Nguyen (2007).

2.3.4 Análisis por microscopía electrónica de barrido (MEB)

La microscopía electrónica de barrido (MEB) se utilizó para visualizar estructuras morfológicas superficiales que no pueden ser apreciadas con microscopía óptica de especímenes adultos e infectivos juveniles. Estas estructuras se nombran en la tabla 8 junto con la forma de evaluación empleada para caracterizar la especie.

Tabla 8

Estructuras a visualizar mediante microscopía electrónica de barrido (MEB)

Estructura	Forma de evaluación	Tipo de espécimen que se visualizará
Papilas labiales	Presencia o ausencia y conteo	Machos, hembras e infectivos juveniles
Papilas cefálicas	Presencia o ausencia y conteo	Machos, hembras e infectivos juveniles
Aberturas anfidiales	Presencia o ausencia y conteo	Machos, hembras e infectivos juveniles
Espículas	Presencia o ausencia	Machos
papilas genitales	Presencia o ausencia y conteo	Machos

Continúa 

Campo lateral	Presencia o ausencia de canales corporales y conteo	Infectivos juveniles
Cola	Forma de la cola	Machos, hembras e infectivos juveniles

La preparación de las muestras se realizó con la metodología modificada propuesta por Eisenback (1991) tal como se aprecia en la figura 10. Los especímenes adultos de primera y segunda generación (machos y hembras) y los infectivos juveniles se colocaron en tubos eppendorf conteniendo 2 ml de solución Ringer y se calentaron a baño María por 2 minutos para relajar e inactivar a los nematodos (figura 10A). Luego, se lavaron con agua destilada durante 10 minutos por tres veces y luego se realizó la fijación en glutaraldehído al 3% tamponado con fosfato de sodio 0,05 M a pH 6,8 a 4°C durante 24 horas (figura 10B). Después, se colocaron los nematodos en una solución de tetróxido de osmio (OsO₄) al 1% durante 12 horas a 4°C (post-fijación, figura 10C). Transcurrido este tiempo, los NEPs se lavaron con agua destilada durante 10 minutos por tres veces y se deshidrataron a diferentes concentraciones de etanol (20%, 30%, 50%, 70%, 90%, 95% y 100%) por 10 minutos en cada concentración (figura 10D). Al terminar este proceso, se almacenaron los recipientes en nitrógeno líquido por 24 horas y se liofilizaron por aproximadamente 8 horas (figura 10E). Finalmente, los NEPs se colocaron sobre portabjetos de MEB de aluminio conteniendo una cinta de carbón adhesiva y se revistieron con polvo de oro (20 nm de espesor) con el evaporador Q150R y se observaron en el microscopio electrónico de barrido MIRA 3, Tescan® del laboratorio de Caracterización de Nanomateriales de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE (figura 10F).

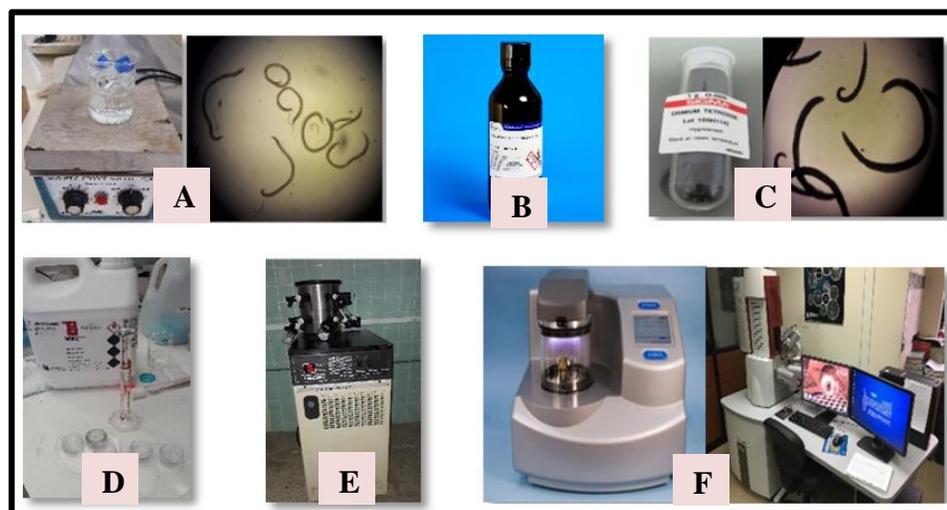


Figura 10. Preparación de muestras de NEPs para la visualización en el MEB
Nota: **A)** Muerte de NEPs; **B)** Fijación, **C)** Postfijación, **D)** Deshidratación, **E)** Liofilización, **F)** Cubrimiento con oro y visualización en el MEB.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1 Análisis moleculares

3.1.1 Extracción y cuantificación del ADN

La extracción del ADN de los nematodos entomopatógenos (NEPs) de cada aislamiento (CB13, H04D, H01G y 2TH) se realizó siguiendo el protocolo de Nguyen (2007) mencionada en la metodología, y su efectividad se comprobó mediante el proceso de cuantificación. En la tabla 9 se observa los resultados obtenidos de la cuantificación; los valores promedio obtenidos de la concentración (ng/μL) y absorbancia (260/280) fueron de 190.827 ng/μL y 0.508 respectivamente al extraer el ADN de 1 hembra adulta por cada aislamiento.

Tabla 9

Datos de la cuantificación del ADN extraído de 1 hembra adulta por cada aislamiento

Muestra	260/280	ng/μL
CB13	0.471	275.038
H04D	0.468	236.417
H01G	0.552	12.423
2TH	0.542	239.430
Promedio	0.508	190.827

3.1.2 Amplificación del ADN por PCR

La amplificación de la región ITS (ITS1-5.8S-ITS2) del ADNr se realizó con éxito mediante el uso de *primers* universales, TW81 (*forward*) y AB28 (*reverse*), según la metodología modificada de Gutiérrez-Gutiérrez *et al.* (2011). En el gel de electroforesis de la figura 11 se muestra la eficacia de estos *primers* ya que se observaron bandas muy claras en todos los aislamientos amplificados. Además el gel reveló una longitud de 800 bp de la región ITS para los cuatro aislamientos.

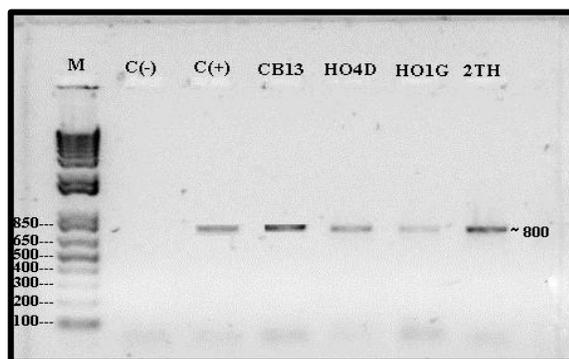


Figura 11. Fotografía de productos amplificados por PCR de la región ITS del ADNr de los aislamientos CB13, H04D, H01G y 2TH

Nota: **M)** Marcador de peso molecular, (-) control negativo, (+) control positivo. Las bandas observadas son de 800 pb.

La amplificación de la región D2D3 del gen 28S del ADNr se realizó mediante el uso de los *primers* D2A (*forward*) y D3B (*reverse*) según el protocolo modificado de Subbotin *et al*, (2000). El gel de electroforesis, de la figura 12, muestra una longitud de 620 pb del fragmento D2/D3 para los cuatro aislamientos. También se observaron bandas muy claras dentro del gel demostrando así la eficacia del par de *primers* en el proceso de amplificación.

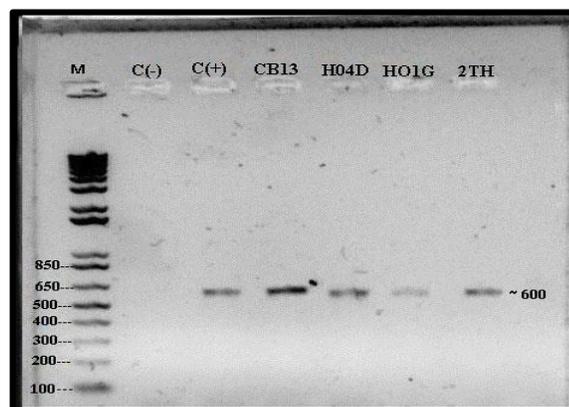


Figura 12. Fotografía de productos amplificados por PCR de la región D2/D3 del ADNr de los aislamientos CB13, H04D, H01G y 2TH

Nota: **M)** Marcador de peso molecular, (-) control negativo, (+) control positivo. Las bandas observadas son de 620 pb.

3.1.3 Secuenciación de los aislamientos

Los productos PCR de las muestras amplificadas, tanto para la región ITS como para el segmento de expansión D2D3, se secuenciaron. Los resultados de las secuencias se editaron en el programa Chromas 2.6 y BioEdit 7.2.5 y se obtuvieron las secuencias consenso que se describen en el anexo E.

En la tabla 10 se observa que el tamaño de la secuencia consenso de la región ITS de las muestras CB13, H04D, 2TH y H01G provenientes de las provincias de Carchi, Chimborazo y Tungurahua, presentan valores de 800 pb.

Por otro lado, el tamaño de las secuencias consenso del segmento de expansión D2D3 muestran valores de 620 pb., entre todas las muestras obtenidas de las diferentes provincias.

Tabla 10

Tamaño de las regiones amplificadas

Muestra	Género Hipotético	Provincia	Tamaño región ITS	Tamaño región D2D3
CB13	<i>Steinernema</i> spp.	Carchi	800 pb	620 pb.
H04D	<i>Steinernema</i> spp.	Chimborazo	800 pb.	620 pb.
H01G	<i>Steinernema</i> spp.	Chimborazo	800 pb.	620 pb.
2TH	<i>Heterorhabditis</i> spp.	Tungurahua	800 pb.	620 pb.

Los tamaños de las secuencias consenso obtenidas de la región ITS y D2D3 corroboran los resultados mostrados en el gel de electroforesis del apartado anterior.

3.1.4 Análisis de las secuencias

Las secuencias consenso de las regiones ITS y D2D3 de los aislados estudiados se compararon, de forma independiente, con los datos existentes disponibles en GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). En el anexo F se muestran los resultados de la búsqueda realizada en el programa bioinformático BLAST con cada uno de los aislados junto con las identidades y coberturas obtenidas en este estudio.

Las secuencias de las regiones ITS de los aislamientos H04D y 2TH mostraron una similitud del 99% con la especie de *S. feltiae* con coberturas de 99% y 95% respectivamente; en cambio las secuencias de los aislamientos CB13 y H01G mostraron una identidad de 83% y 87% con coberturas del 95% y 100% cada una, respectivamente.

Los mejores resultados del BLAST se desplegaron con las secuencias de la región D2D3 de los 4 aislamientos cuyas identidades fue de 99% con la especie de *S. feltiae* y coberturas superiores al 97%. En la tabla 11 se resume los resultados obtenidos junto con el número de accesoión de la especie con la que presentó la cobertura e identidad máxima.

Tabla 11

Especie identificada y el número de accesoión de la especie con la que presentó una alta identidad

BLAST para las secuencias de la región ITS				
Aislamiento	Especie identificada	Máximo de identidad	Cobertura	Número de Accesoión
CB13	<i>S. feltiae</i>	83%	95%	FJ860040
H04D	<i>S. feltiae</i>	99%	99%	LN611139
H01G	<i>S. feltiae</i>	87%	100%	JF728858
2TH	<i>S. feltiae</i>	99%	95%	LN611139
BLAST para las secuencias de la región D2D3				
Aislamiento	Especie identificada	Máximo de identidad	Cobertura	Número de Accesoión
CB13	<i>S. feltiae</i>	99%	98%	JF728852
H04D	<i>S. feltiae</i>	99%	99%	JF728852
H01G	<i>S. feltiae</i>	99%	98%	JF728852
2TH	<i>S. feltiae</i>	99%	99%	JF728852

3.1.5 Análisis filogenético

Se realizó el análisis filogenético de las secuencias de la región ITS de los cuatro aislamientos, CB13, H04D, H01G y 2TH. El árbol filogenético se construyó por el método de parsimonia máxima en el programa bioinformático MEGA 7, a partir de las secuencias que se obtuvieron de la región ITS con las secuencia de los organismos más próximos con un alto porcentaje de identidad (figura 13).

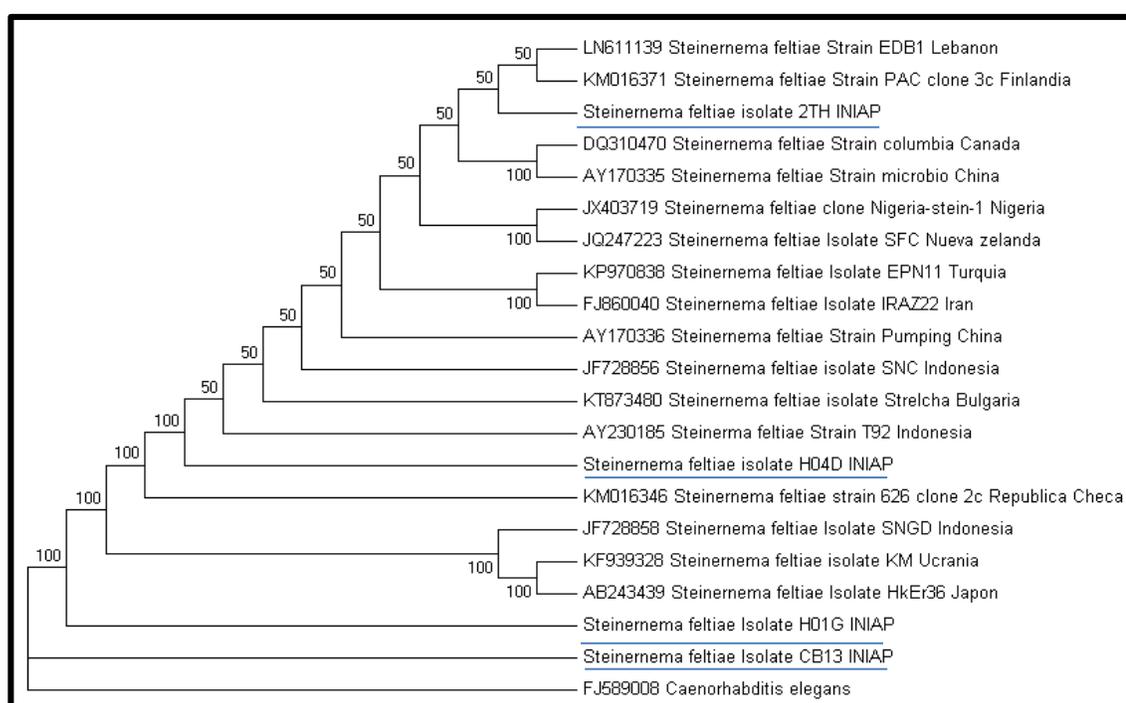


Figura 13. Relación filogenética de los 4 aislamientos de la EESC con 16 especies de *S. feltiae*, partiendo de las secuencias de la región ITS del ADNr y empleando el método de máxima parsimonia.

Nota: El árbol de consenso bootstrap inferido a partir de 1000 repeticiones se tomó para representar la historia evolutiva de los taxones analizados. La especie *Caenorhabditis elegans* (FJ589008) se utilizó como grupo externo. Los valores de probabilidad bootstrap <50 no se muestran.

Los resultados del árbol colocaron al aislamiento 2TH en un clado con aislados de *Steinernema feltiae* de Lebanon y Finlandia; el aislamiento H04D en un clado cercano con aislamientos de *S. feltiae* pertenecientes a Indonesia. En cambio los aislados H01G y

CB13 resultaron ser los más lejanos a todos los demás clados de *Steinernema feltiae*, corroborando los resultados del apartado anterior en el que se mostraba un porcentaje de identidad bajo para estos aislamientos.

La construcción del árbol filogenético a partir de las secuencias de la región D2D3 de los cuatro aislamientos en estudio se realizó, igualmente, mediante el método de parsimonia máxima en el programa bioinformático MEGA 7. En la figura 14 se muestra la ubicación de los aislamientos dentro del árbol al ser comparadas con otras especies de *Steinernema*.

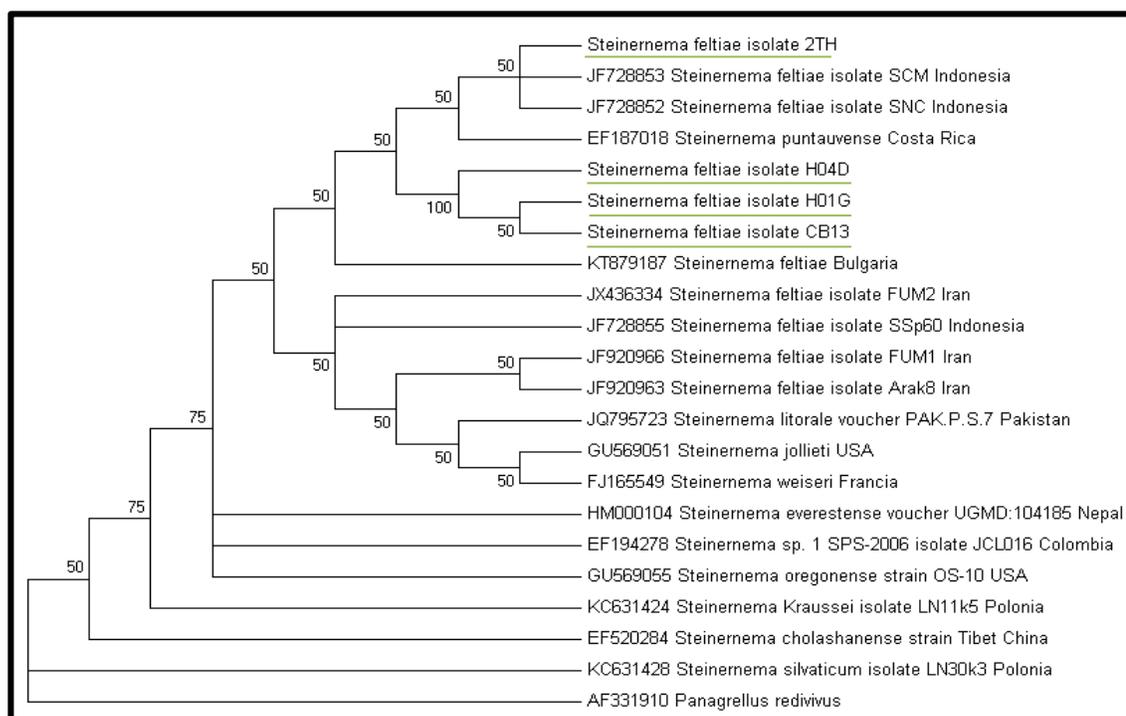


Figura 14. Relación filogenética de *Steinernema feltiae* del INIAP con 17 especies de *Steinernema* basado en el análisis de la región D2D3 del gen 28S rDNA, utilizando el método de máxima parsimonia.

Nota: El árbol de consenso bootstrap, inferido a partir de 1000 repeticiones, se toma para representar la historia evolutiva de los taxones analizados. La especie *Panagrellus redivivus* (AF331910) se utilizó como grupo externo. Los valores de probabilidad bootstrap <50 no se muestran.

En el árbol se puede observar que los aislados CB13, H04D, H01G y 2TH, presentan gran similitud con los aislados de *Steinernema feltiae* de Indonesia ya que se colocaron dentro del mismo clado. Estos datos corroboran los resultados obtenidos del BLAST en el que se mostraba que todos los aislamientos presentaban una identidad del 99% con cepas de *S. feltiae* provenientes de Indonesia.

Dentro del mismo clado, se observa también que las especies *S. feltiae* de los 4 aislamientos en estudio y los de Indonesia, son hermanos cercanos a otra especie de *Steinernema* denominada *S. puntauvense*.

3.2 Caracterización morfológica

Las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) proporcionaron datos sobre la estructura externa del nematodo permitiendo su caracterización morfológica. En cada micrografía se registró las estructuras principales de la especie por estadios y las medidas que se tomaron con el MEB se muestran en la tabla 12 y en el anexo G. Las medidas registradas muestran que los especímenes machos y hembras de primera generación son de mayor longitud que los especímenes machos y hembras de segunda generación.

Tabla 12

Mediciones con MEB de *S. feltiae* por estadios

Morfometría con MEB	
Espécimen	medida
Infectivo Juvenil	653.81 μm
Macho de primera generación	961.36 μm
Macho de segunda generación	739.32 μm
Hembra de primera generación	2944.34 μm
Hembra de segunda generación	1368.41 μm

3.2.1 Infecciosos juveniles (IJ)

La caracterización morfológica de especímenes juveniles de *S. feltiae* se muestra en la figura 15.

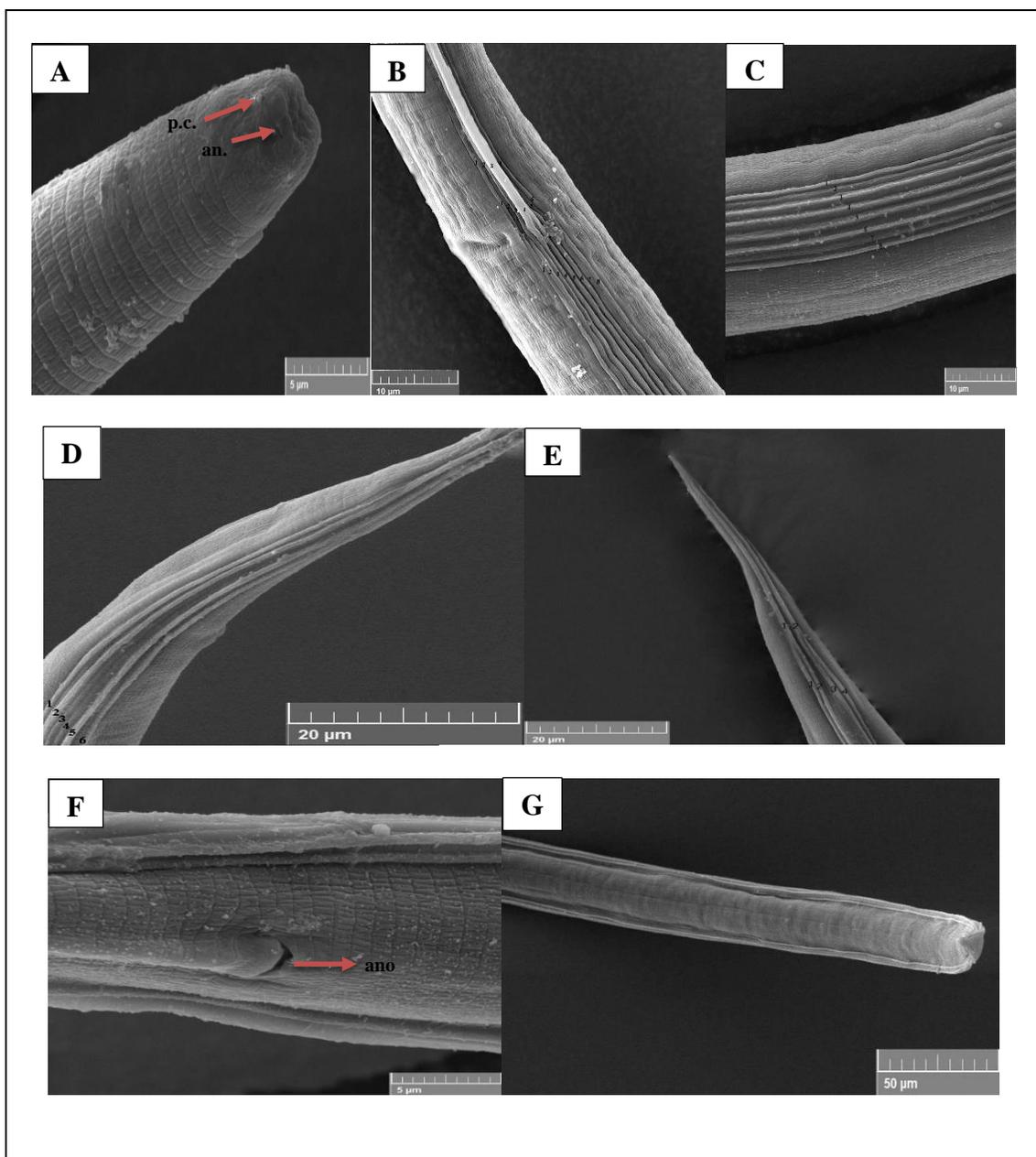


Figura 15. Micrografías de un infectivo juvenil de *Steinernema feltiae*

Nota: **A)** Se muestra la región de la cabeza finamente redondeada con 4 papilas cefálicas (p.c.) y una abertura anfídial (an.); **B)** Campo lateral de la región anterior muestra inicialmente un aumento de 4 a 6

crestas; **C)** Campo lateral con 8 crestas en el cuerpo medio; **D-E)** Campo lateral de la parte posterior mostrando la reducción gradual a 6 crestas para hacerse 4 y terminar en 2 crestas; **F)** Parte ventral de la región de la cola mostrando la posición del ano; **G)** El cuerpo se muestra casi recto, delgado y gradualmente ahusado en la parte posterior.

Entre las características externas se destaca una longitud de aproximadamente 653.81 μm . Muestran un cuerpo casi recto y delgado (figura 15G). La región de la cabeza es fina y redondeada (figura 15A). No se observa papilas labiales pero sí 4 papilas cefálicas (p.c.) distribuidas simétricamente alrededor de la cabeza, además presenta una anfidia (an.) ubicada casi a nivel de las cuatro papilas cefálicas (figura 15A). Además se visualizó una boca cerrada y estrías transversales finas en la cutícula (figura 15A). La vista de los campos laterales comienzan en la región anterior con 4 crestas, siendo una de ellas muy prominente (figura 15B). Cerca del nivel del poro excretor las 4 crestas se separan en 6 hasta incrementarse en 8 crestas separadas por 9 líneas distintas uniformemente espaciadas y desarrolladas (figura 15B y 15C). El patrón de 8 crestas se extiende posteriormente hasta cerca del ano; después, el número de crestas se reducen a 6 (figura 15D), luego a 4 para finalmente terminar en 2 extendiéndose casi hasta la punta de la cola (figura 15E). Con la descripción anterior, la fórmula para la disposición de las crestas desde la cabeza hasta la cola es: 4, 6, 8, 6, 4, 2; por último la cola muestra una forma larga, con el extremo en punta (figura 15E).

3.2.2 Especímenes machos de primera generación

La caracterización morfológica de especímenes machos de primera generación de *S. feltiae* se muestra en la figura 16.

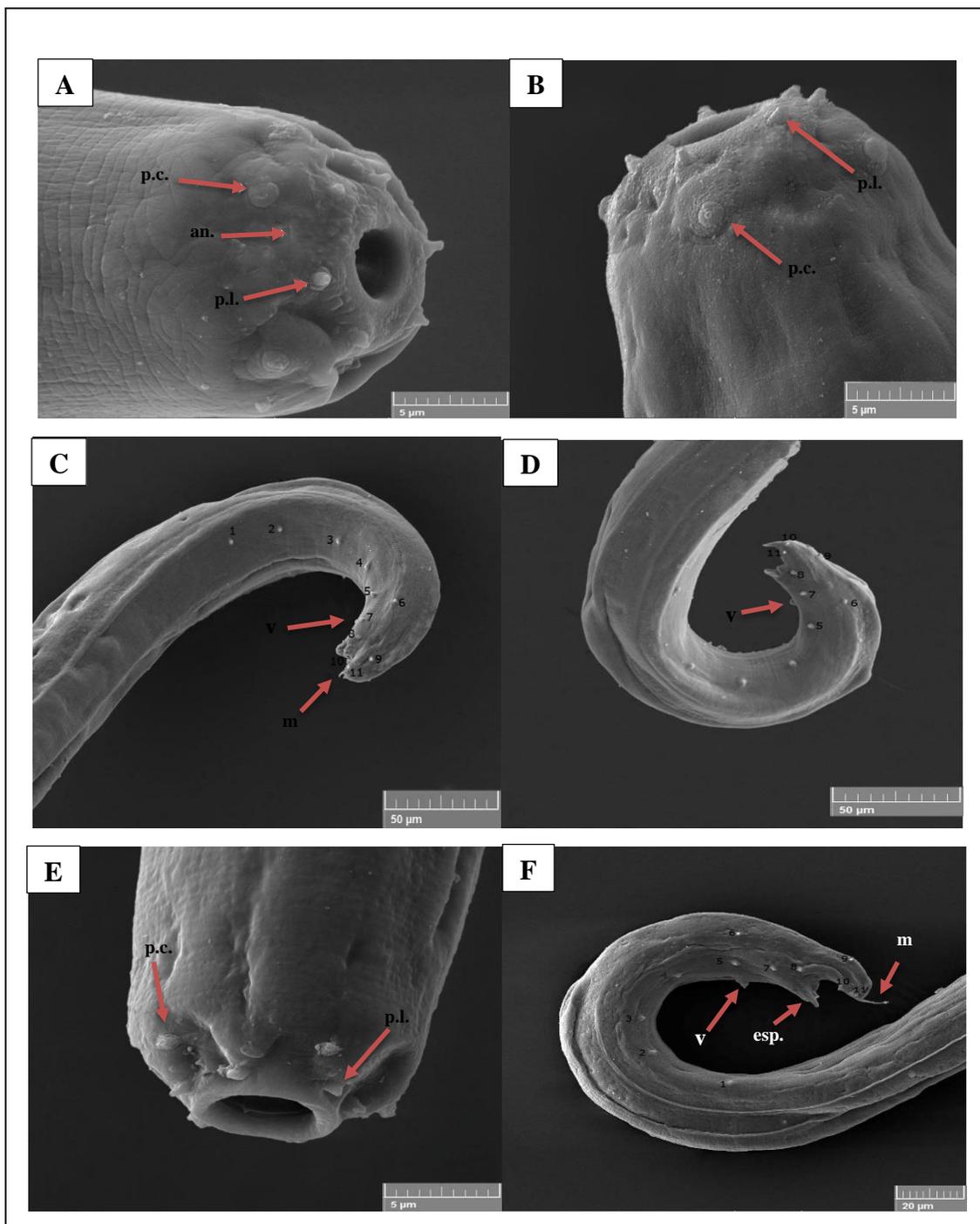


Figura 16. Micrografías de especímenes machos de *Steinernema feltiae*

Nota: **A-B)** Cabeza masculina de primera generación muestra 6 papilas labiales (p.l.), 4 papilas cefálicas (p.c.) y una abertura anfidial (an.); **C-D)** Cola de espécimen macho de primera generación muestra el mucrón (m), espícula pareada (esp.), 11 pares de papilas genitales y una sola papila ventral (v); **E)** Cabeza masculina de segunda generación con 6 papilas labiales y 4 papilas cefálicas **F)** Cola de espécimen macho

de segunda generación muestra el mucrón (m) y espícula pareada (esp.) junto con 11 pares de papilas genitales (1-11) distribuidos de forma similar a los machos de primera generación.

Las micrografías muestran que los especímenes presentan un cuerpo delgado, curvados ventralmente, en forma de J (figura 16D). La longitud es de 961.36 μm y la cutícula presenta finas estrías transversales visibles. La cabeza se muestra truncada ligeramente redonda, con 6 papilas labiales (p.l.) y 4 papilas cefálicas (p.c.), además presenta una anfídia (an.) localizada lateralmente entre el círculo labial y cefálico de las papilas (figura 16A y 16B). La región posterior del espécimen muestra espículas pareadas y la cola tiene una terminación redondeada y con presencia de mucrón (m) (figura 16C). También presenta en su totalidad 23 papilas genitales dispuestas en 11 papilas pares y una papila media ventral (v) situada justo antes de la abertura cloacal (figura 16C y 16D). Las papilas pareadas se distribuyen de la siguiente manera: seis pares precloacales subventrales (numeración 1, 2, 3, 4, 5, 7), un par precloacal lateral (ligeramente subdorsal, numeración 6); un par de papilas subventral adcloacal (numeración 8); y 3 pares postcloacales (un par subdorsal que corresponde a la numeración 9 y dos pares subventral terminal que corresponden a la numeración 10 y 11) (figura 16C y 16D).

3.2.3 Especímenes machos de segunda generación

La morfología general es similar a los machos de primera generación, pero estos son de menor tamaño, 739.32 μm (figura 16E y 16F). La cola presenta un mucrón (m) grande y se observa una espícula (esp.) pareada y prominente (figura 16F).

3.2.4 Especímenes hembras de primera generación

La caracterización morfológica de especímenes hembras de primera generación de *S. feltiae* se muestra en la figura 17.

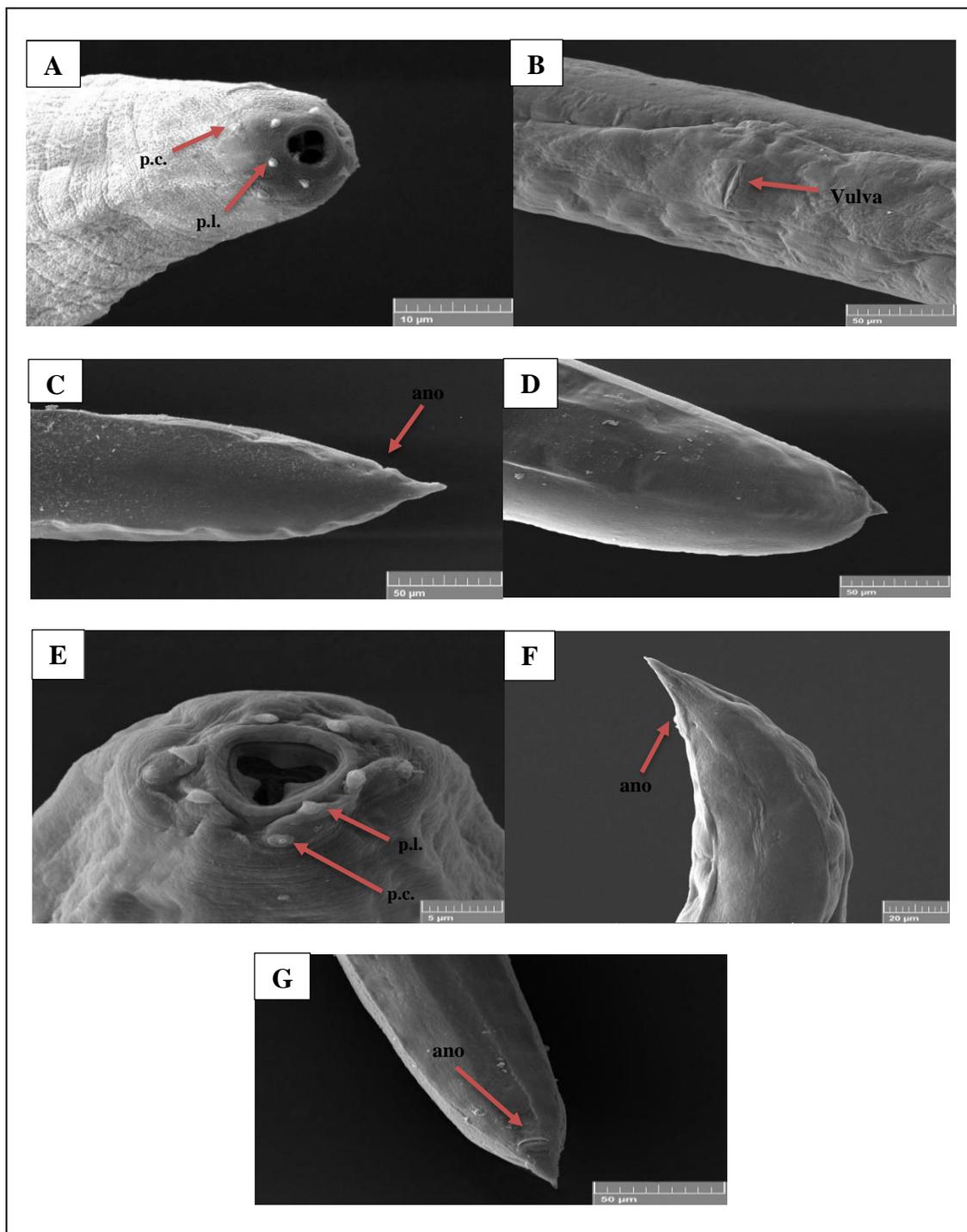


Figura 17. Micrografías de especímenes hembras de *Steinernema feltiae*

Nota: **A)** cabeza femenina de primera generación muestra 6 papilas labiales (p.l.), 4 papilas cefálicas (p.c.) y cutícula anulada; **B)** abertura vulval femenina de primera generación con labios salientes y ligeramente asimétricos; **C)** abertura anal femenina de primera generación con labios post-anales sobresalidos y

asimétricos; **D**) cola femenina de primera generación gruesa y con terminación en punta cónica corta; **E**) cabeza femenina de segunda generación similar a las hembras de primera generación; **F-G**) La cola tiene una forma conoide y con hinchazón post-anal.

En las micrografías se observan anulaciones en la cutícula. La cabeza se presenta bruscamente redondeada y ligeramente adelgazada anteriormente con 6 papilas labiales y 4 papilas cefálicas (figura 17A). La longitud es de 2944.34 μm . Presenta la abertura vulval cerca del centro del cuerpo con labios salientes y ligeramente asimétricos (labio posterior más grande que el labio anterior) (figura 17B). Los labios post-anales sobresalen y se muestran asimétricos, el labio anterior es más pequeño que el labio posterior (figura 17C). La cola (parte de cuerpo que se ubica después de la abertura anal) es gruesa y terminan en punta cónica corta (figura 17D).

3.2.5 Especímenes hembras de segunda generación

Es similar a la hembra de primera generación, pero más pequeña (figura 17E), la longitud del cuerpo es aproximadamente 1368.41 μm . La cola tiene una forma conoide y con hinchazón post-anal (figura 17G). La vulva presenta labios sobresalientes y simétricos.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

En esta investigación se utilizó los nematodos entomopatógenos (NEPs) pertenecientes a la colección de la Estación Experimental Santa Catalina (EESC) del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), los cuales se colectaron en los años 2004-2006 de las provincias de Carchi, Cotopaxi, Chimborazo y Tungurahua por Hernández (2006). Los cuatro aislamientos que se utilizaron son: CB-13 (Carchi), H04D y H01G (Chimborazo) y 2TH (Tungurahua), mismos que se identificaron como *Steinernema* (CB13, H04D, H01G) y *Heterorhabditis* (2TH). La identificación inicial se realizó en base a la coloración de la larva infectada en *G. mellonella*: color ocre (*Steinernema*) y color café rojizo (*Heterorhabditis*) tal como se describe en los estudios realizados por Bedding & Akhurst (1975), Castillo *et al.* (2011) Fernandez *et al.* (2017).

La identificación de las especies presentes en cada uno de los aislamientos, se inició con el proceso de extracción del ADN de nematodos hembras de primera generación ya que, según Kuwata *et al.* (2006), Campos-Herrera *et al.* (2006) y Hominick *et al.* (1997), estos especímenes son más fáciles de manejar por su tamaño y se puede extraer una mayor cantidad de ADN. La extracción se realizó siguiendo el protocolo de Nguyen (2007), el ADN se cuantificó en el espectrofotómetro y se obtuvo una concentración promedio de 190.827 ng/ μ L, con el valor más bajo para el aislamiento H01G (12.423 ng/ μ L). Este resultado pudo deberse a varios factores: a) no se produjo una lisis completa de las células, b) errores de pipeteo al momento de colocar los reactivos y c) en la cualificación no se tomó una muestra representativa de ADN, de acuerdo a lo que indica Catasús & Matías-Gulu (1997). A pesar de esto, Bolívar *et al.* (2014) menciona que la cantidad de ADN puede ser de tan sólo 1 ng sin perjudicar el proceso de PCR.

El valor promedio de absorbancia (260/280) fue de 0.508, e indica una baja pureza del ADN extraído, ya que el valor óptimo es de 1.8-2 según lo describe Alonso (2017). Esta variación posiblemente se deba a la presencia de proteínas o fracciones de membrana en las muestras que indican contaminación (Brusés *et al.*, 2000); sin embargo, estos

resultados no influyeron en los procesos de PCR realizados en este estudio ya que la amplificación se realizó exitosamente. Cabe recalcar que este trabajo no requirió pureza y calidad alta debido a que los marcadores moleculares seleccionados (ITS y D2D3) amplifican bien aún en concentraciones bajas de ADN (2-3 μ L) (Gutiérrez-Gutiérrez *et al.*, 2011; Subbotin *et al.*, 2000)

La amplificación de las regiones ITS y D2D3, se seleccionaron en base a los estudios de Stock (2002), Nguyen (2007), Tamiru *et al.* (2012) y Çimen *et al.* (2015), donde indican que estas regiones son las más importantes dentro del ADNr para estudiar a los nematodos en diferentes niveles moleculares. La amplificación de la región ITS y D2D3 se realizó según el protocolo de Subbotin *et al.* (2000) y de Gutiérrez-Gutiérrez *et al.* (2011), respectivamente, con la finalidad de realizar árboles filogenéticos para compararlos aislamientos de la EESC-INIAP, con otras especies o cepas de otras regiones que se hayan reportado hasta actualidad. Según Lephoto (2013), la región ITS es altamente conservada en muchas especies de nematodos y se la puede utilizar para realizar reconstrucciones filogenéticas e identificar especies. Por otro lado Stock (2009) menciona que el segmento D2D3 es una región de expansión que evoluciona lentamente, haciendo que sea apropiado para crear árboles filogenéticos y revelar diferencias entre la mayoría de las especies.

Los *primers* TW81/AB28 y D2A/D3B son considerados como universales para la amplificación respectiva de las regiones ITS y D2D3 del ADNr del nematodo. Su eficacia ha sido comprobada en estudios similares realizados por Tamiru *et al.* (2012), Abdolmaleki *et al.* (2016) y Gokce *et al.* (2013). En el presente estudio, estos *primers* amplificaron exitosamente las regiones anteriormente mencionadas, siguiendo el protocolo de Gutiérrez-Gutiérrez *et al.* (2011) y Subbotin *et al.* (2000). El gel de electroforesis reveló bandas muy claras para todos los aislamientos y amplicones de 800 pares de bases para la región ITS y 620 pares de bases para la región D2D3. Resultados similares obtuvo Tamiru *et al.* (2012) en el que utilizaron el mismo par de *primers* y obtuvieron fragmentos de 800 bp para los ITS y 650 bp para el segmento de expansión D2D3. De la misma manera De Brida y sus colaboradores (2017) amplificaron la región

D2/D3 de nematodos aislados de áreas agrícolas en Brasil y describieron amplicones con una longitud 590 bp. De forma similar Abdolmaleki *et al.* (2016) reportó un tamaño de 750 pb en la amplificación de la región ITS de *S. feltiae* de aislados de nematodos en Irán. Estos resultados muestran que las regiones son de tamaño similar en los nematodos y que se encuentran dentro de los rangos esperados: 800-1000 pb., para la región ITS y 500-750 pb., para la región D2D3 según lo mencionado por Hominick *et al.* (1997) y De Ley *et al.* (1999).

Los productos PCR de la región ITS y D2D3 de los cuatro aislamientos se secuenciaron y los resultados obtenidos se compararon con la base de datos en el GenBank. Los análisis por BLAST de las secuencias ITS de los aislamientos 2TH y H04D mostraron un porcentaje de identidad de 99% con *S. feltiae* (LN611139), el cual se considera como un porcentaje confiable para afirmar que se trata de la especie desplegada en el programa (Robles, 2013); en cambio los aislamientos CB13 y H01G presentaron porcentajes de identidad de 83% y 87% respectivamente. Estos bajos porcentajes posiblemente se deban a errores de lectura en la secuenciación, ya que en el proceso de obtención de las secuencias consenso se observaron muchas incongruencias en los pares de bases. Resultados similares se obtuvieron en los estudios realizados por Negrete (2013) al analizar secuencias ITS en sus aislamientos, afirmando una mala calidad de las secuencias, por tal razón este investigador descartó estas secuencias para los análisis posteriores.

El análisis filogenético mostrado en la figura 13 muestra que los aislamientos CB13 y H01G se encuentran muy apartados de la especie de *S. feltiae* especialmente el aislamiento CB13 que no se introdujo en ningún clado. Este resultado confirma los análisis obtenidos en el BLAST, en el que estos aislamientos presentaron bajos porcentajes de identidad con la especie *S. feltiae*; no obstante, los aislamientos 2TH y H04D se presentan como los más cercanos a las especies de *S. feltiae* provenientes de Finlandia e Indonesia, respectivamente.

Los análisis por BLAST de las secuencias del segmento de expansión D2D3 de los aislamientos presentaron un porcentaje de identidad de 99% con *S. feltiae* del mismo

número de accesión (JF728852) y porcentajes menores a 98% con otras especies de *Steinernema* principalmente con *S. litorale*, *S. jollieti* y *S. weiseri*. Este resultado tiene concordancia con lo descrito por Nguyen *et al.* (2007), quien menciona que *S. feltiae* pertenece a un grupo de especies similares, el mismo que está conformado por *S. kraussei*, *S. oregonense*, *S. weiseri*, *S. jollieti*, *S. silvaticum* y *S. litorale*.

El árbol filogenético de la figura 14 confirma la relación establecida entre los aislamientos de la EESC-INIAP y las otras especies de *Steinernema*, especialmente con *S. puntauvense*. Este dato se corrobora con los análisis obtenidos por Uribe-lorío & Stock (2007) quienes encontraron que *S. puntauvense* es hermano cercano de *S. feltiae* y está incluido dentro de un clado que comprende otras especies morfológicamente similares, tales como *S. kraussei* y *S. oregonense*. Además, se observó que los aislamientos H04D, H01G y H04D son hermanos cercanos y se relacionan con aislamientos de *S. feltiae* provenientes de Indonesia, en especial el aislamiento 2TH.

Mediante los análisis moleculares se comprobó también que el aislamiento 2TH no corresponde al género *Heterorhabditis* reportado inicialmente, ya que en el proceso de renovación se observó que todas las larvas infectadas (*G. mellonella*) con NEPs presentaban una coloración ocre y no se observó la coloración café rojizo, característica que es atribuida a la coloración de la larva cuando se encuentra infectada con el género *Heterorhabditis* según Hernández (2006). Esta coloración ocre que daba a suponer la presencia única del género *Steinernema* se confirmó con el BLAST que desplegó porcentajes altos de identidad con *Steinernema* en todos los aislamientos; en base a estos resultados se puede mencionar que el análisis de coloración debe ser complementado con otras técnicas de identificación ya que según Morton (2009) las larvas infectadas pueden dar otras coloraciones que va desde ocre al casi negro para el género *Steinernema* y un color rojizo, naranja, amarillo o verde para el género *Heterorhabditis*, pudiendo dar lugar a pequeñas confusiones. Por lo tanto en una identificación se parte de la observación de la coloración de las larvas infectadas, pero requiere metodologías complementarias tal como lo muestran Abdolmaleki *et al.* (2016), Cho (2009), Malan *et al.* (2011) y Negrete (2013), quienes realizan una caracterización morfológica, mediante microscopía óptica;

molecular, mediante técnica PCR; secuenciación y finalmente complementarla con microscopia electrónica de barrido para identificar géneros y especies.

Otra posible causa de la detección de *Steinernema* en el aislamiento 2TH es que pudo haberse producido una contaminación del aislamiento original con la especie *S. feltiae*, ya que cada 3 y 6 meses se debe realizar el proceso de renovación para obtener nuevos infectivos juveniles (IJs), prolongar la supervivencia del aislamiento y evitar el extravío de la especie (Castillo *et al.*, 2011).

Dentro de los resultados de los análisis moleculares también se destacó que no existía la presencia de ninguna otra especie del género *Steinernema* y que la única que prevalecía en todos los aislamientos era *S. feltiae*. Esto probablemente se deba a que la mayoría de los aislamientos se obtuvieron de lugares (Carchi, Chimborazo y Tungurahua) con altitudes superiores a 3000 msnm y temperaturas por debajo de los 15°C (Hernández, 2006); condiciones que, según Van & Malan (2014), permiten la supervivencia y funcionamiento óptimo del género *Steinernema* y donde la especie *S. feltiae* es más abundante. En cambio la presencia de *Heterorhabditis* está ligado a regiones tropicales (Nguyen, 2007). Este dato se corrobora con el estudio de Rosa *et al.* (2000), que mencionan que la altitud influye en la distribución de ambos géneros en las Islas de Azores; el género *Heterorhabditis* fue más abundante en altitudes bajas y va disminuyendo conforme aumenta la altitud, en donde empieza a ser más abundante el género *Steinernema*. Nguyen, *et al.* (2007), menciona que *S. feltiae* es la especie más común y extendida con una distribución casi cosmopolita y su detección se ha reportado en regiones como Europa, Norte América, Sur América, Australia, Nueva Zelanda y África, por tanto es muy común que esta especie sea la más caracterizada y utilizada a nivel mundial.

Otro factor que podría explicar la presencia única de *S. feltiae* en todos los aislamientos es que fue la única que se adaptó a las condiciones de almacenamiento del INIAP, ya que como lo menciona Sáenz, (2005), no todas las especies soportan las mismas condiciones y temperaturas de almacenamiento, así por ejemplo *S. feltiae* es una especie

capaz de sobrevivir y funcionar a temperaturas inferiores a 15° C; en cambio, *S. riobrave* es más tolerante al calor y sobrevive incluso a temperaturas de 29°C (Van & Malan, 2014).

Finalmente, la caracterización morfológica se realizó mediante microscopía electrónica de barrido. La caracterización consistió en un examen cualitativo y cuantitativo de los rasgos de los cinco estadios de la especie que corresponden a adultos de primera y segunda generación (machos y hembras) e infectivos juveniles. Los resultados obtenidos muestran que los individuos siguen el mismo patrón morfológico externo reportado por Nguyen *et al.* (2007) para *S. feltiae*. De forma similar Nikdel & Niknam (2015), aislaron a *S. feltiae* del bosque de Arasbaran en Irán y la caracterizaron mediante métodos morfométricos, morfológicos, moleculares y por microscopía electrónica de barrido, reportando los mismos patrones morfológicos externos que se observaron en este estudio. En base a estos estudios se confirma que la especie analizada en esta investigación se trata de *S. feltie*. Sin embargo la longitud de los infectivos juveniles (653.81 µm), machos de primera generación (961.36 µm), machos de segunda generación (739.32 µm), hembras de primera generación (2944.34 µm) y hembras de segunda generación (1368.41 µm) difieren de las reportadas en Nguyen *et al.* (2007) cuyos datos muestran longitudes de mayor tamaño para cada estadio obtenidas por microscopía de Luz. Estas diferencias en tamaño posiblemente se debe a que, en el momento de la preparación de las muestras antes de visualizar en el MEB, los nematodos sufren un encogimiento por el proceso deshidratación y secado tal como lo menciona Hooper (1988) y Eisenback (1991). Por tanto las medidas obtenidas por MEB pueden variar de las obtenidas en microscopía de luz en la cual solo se realiza el proceso de fijación para tomar las medidas de los nematodos (Nguyen, 2007).

Otra variante que se observó en esta investigación es que los campos laterales de los infectivos juveniles (IJs) comienzan anteriormente con cuatro crestas poco diferenciadas, siendo una de ellas muy prominente (Fig. 16B). Resultados diferentes se reportaron en los estudios de Nikdel & Nikman (2015) y Nguyen *et al.* (2007), los cuales describen que los campos laterales de *S. feltiae* comienzan anteriormente con una línea seguida por dos líneas adicionales para formar dos crestas. Por lo tanto, la variante

obtenida en este estudio se deba posiblemente a que se produjo un daño en esa parte de la cutícula del IJ al momento del secado por liofilización haciendo que las líneas y crestas del campo lateral no se diferencien de manera adecuada, ya que la liofilización es un método de secado alternativo y poco utilizada por los nematólogos (Eisenback, 1991). Para superar este problema Nguyen & Duncan (2002) y Hominick *et al.* (1997) sugieren realizar el secado mediante punto crítico con CO₂ líquido o Freón para obtener excelentes micrografías. Cabe mencionar que en esta investigación se utilizó la liofilización debido a que no se disponía del equipo necesario para el secado por punto crítico mediante CO₂ líquido; sin embargo, esta metodología no afectó a los otros estadios de los nematodos y se obtuvieron imágenes igualmente buenas.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

El presente estudio permitió identificar y caracterizar a la especie de nematodo entomopatógeno (NEP) denominado *Steinernema feltiae* mediante la técnica PCR y microscopía electrónica de barrido. En base a los resultados obtenidos se presentan las siguientes conclusiones:

- El proceso de amplificación por PCR se realizó exitosamente con los *primers* universales TW81/AB28 y D2A/D3B, permitiendo la visualización de bandas claras en el gel de electroforesis con fragmentos de 800 y 620 pares de bases de las regiones ITS y D2D3 respectivamente.
- El resultado de la secuenciación de las regiones ITS y D2D3 determinó que los individuos analizados de cada aislamiento de la colección en la Estación Experimental Santa Catalina (EESC), pertenecen a la especie *Steinernema feltiae*. Con las técnicas moleculares utilizadas se descartó la presencia de individuos del género *Heterorhabditis*.
- En los análisis moleculares se construyeron árboles filogenéticos mediante la metodología de Máxima Parsimonia con las secuencias de los fragmentos ITS y D2D3, lo cual permitió observar que los cuatro aislamientos de la EESC se asemejan mayoritariamente a especies de *Steinernema feltiae* de Indonesia.
- Las micrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido corroboró los resultados de los análisis moleculares permitiendo la caracterización morfológica de la especie *Steinernema feltiae* con base a claves taxonómicas reportadas bibliográficamente.

CAPÍTULO VI

RECOMENDACIONES

El empleo de esta investigación ayudará en la identificación de otras especies de nematodos entomopatógenos en estudios futuros, sin embargo se plantea algunas recomendaciones para la obtención de mejores resultados:

- En la extracción del ADN, se aconseja el uso de hembras adultas en vez de infectivos juveniles porque son más fáciles de manejar debido a su gran tamaño y se puede extraer una mayor cantidad de ADN.
- En los ensayos de microscopía electrónica de barrido, se sugiere probar otras metodologías para el secado de los nematodos como secado por punto crítico con CO₂ líquido o freón debido a que la liofilización es poco recomendable ya que produce un cierto daño en la cutícula del nematodo.
- Se aconseja realizar otros estudios de prospección de nematodos entomopatógenos en otras regiones del país con la finalidad de caracterizar, identificar nuevos especímenes y ampliar la colección de la ESSC-INIAP.
- Se recomienda dar un mejor mantenimiento a las colecciones y tomar las precauciones necesarias para evitar cualquier contaminación entre aislamientos, para evitar la pérdida de especímenes y prologar el tiempo de vida de los infectivos juveniles.

CAPÍTULO VII

BIBLIOGRAFÍA

- Abdolmaleki, A., Maafi, Z. T., Dastjerdi, H. R., Naseri, B., & Ghasemi, A. (2016). Isolation and identification of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria from Kurdistan province in Iran. *Journal Crop Proteccion*, 5(2), 259–271.
- Adams, B. J., & Nguyen, K. B. (2002). Taxonomy and systematics. En *Entomopathogenic Nematology* (pp. 1–33). Wallingford, Oxon, UK: CABI Publishing.
- Adams, B. J., Peat, S. M., & Dillman, A. R. (2007). Phylogeny and evolution. En K. B. Nguyen & D. J. Hunt (Eds.), *Entomopathogenic nematodes: systematics, phylogeny and bacterial symbionts. Nematology Monographs and Perspectives* (pp. 693–733). USA: Koninklijke Brill NV, Leiden, The Netherlands.
- Akhurst, R. J., & Smith, K. (2002). Regulation and safety. En R. Gaugler (Ed.), *Entomopathogenic Nematology* (pp. 311–332). Wallingford, Reino Unido: CAB International.
- Alatorre-Rosas, R., & Kaya, H. K. (1990). Interspecific competition between entomopathogenic nematodes in the genera *Heterorhabditis* and *Steinernema* for an insect host in sand. *Journal of Invertebrate Pathology*, 55(2), 179–188. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(90\)90053-9](https://doi.org/10.1016/0022-2011(90)90053-9)
- Alonso, J. (2017). Cuantificación de ADN. http://joseangelalonso.blogspot.com/2012/12/blog-post_4273.html: [Recuperado el 18/07/2017]
- Argotti, E., Gallegos, P., Alcazar, J., & Kaya, H. (2010). Patogenicidad de nemátodos entomopatógenos del género *Steinernema* y *Heterorhabditis* sobre larvas de *Tecia solanivora* en Ecuador. *Boletín Técnico 9, Serie Zoológica 6*, 162–172.
- Arteaga, N. (2015). *Evaluación de la reproducción masiva de nematodos entomopatógenos (Steinernema spp y Heterorhabditis spp) en larvas de gallina ciega*

- (*Phyllophaga spp*) bajo condiciones controladas. (Tesis de pregrado). Universidad Tecnica Estatal de Quevedo, Los Rios, Ecuador.
- Baddi, M. H., & Abreu, J. L. (2006). Control biológico una forma sustentable de control de plagas (Biological control a sustainable way of pest control). *International Journal of Good Conscience*, 1(1), 82–89.
- Bedding, R. A. (1984). Large-scale production, storage and transport of the insect-parasitic nematodes *Neoaplectana spp.* and *Heterorhabditis*. *Ann Appl Biol.*, 101, 117–120.
- Bedding, R. A., & Akhurst, R. J. (1975). A simple technique for detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. *Nematologica*, 21, 109–110.
- Blaxter, M. L., De Ley, P., Garey, J. R., Liu, L. X., Scheldeman, P., Vierstraete, A., ... Thomas, W. K. (1998). A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature*, 392, 71–75.
- Bolivar, A., Rojas, A., & Garcia-lugo, P. (2014). PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización (PCR and PCR-Multiplex: critical parameters and standardization protocol). *Avances in Biomedica*, 3(1), 25–33. <https://doi.org/10.5123/S2176-6223201000020000>
- Brusés, B., Lucero, H., Aguirre, M., & Gorodner, J. (2000). Comparación de técnicas de extracción de DNA para la detección de *Trypanosoma cruzi* mediante la técnica de PCR. Universidad Nacional del Nordeste. Argentina.
- Campos-Herrera, R., Barbercheck, M., Hoy, C., & Stock, P. (2012). Entomopathogenic Nematodes as a Model System for Advancing the Frontiers of Ecology. *Journal of Nematology*, 44(2), 162–176.
- Campos-Herrera, R., Escuer, M., Robertson, L., & Gutiérrez, C. (2006). Morphological and Ecological Characterization of *Steinernema feltiae* (Rhabditida : Steinernematidae) Rioja Strain Isolated from *Bibio hortulanus* (Diptera : Bibionidae) in Spain. *Journal of Nematology*, 38(1), 68–75.

- Castillo, C., Gallegos, P., Asaquibay, C., & Oña, M. (2011). Guía de prospección y multiplicación de nematodos entomopatógenos para el control biológico de plagas en Ecuador. INIAP, EESC, Departamento Nacional de Protección Vegetal. Quito. Manual Técnico No. 88. 15 p.
- Catasús, L., & Matías-Gulu, X. (1997). Técnicas moleculares para la obtención de DNA y reacción en cadena de la polimerasa. *Hospital de La Santa Creu I Sant Pau*. Barcelona, España. <http://www.conganat.org/seap/revista/v30-n2/15.pdf>: [Recuperado el 03/04/2017]
- Chitra, P., Sujatha, K., & Jeyasankar, A. (2017). Entomopathogenic nematode as a biocontrol agent – Recent trends – A Review. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*, 4(1), 9–20. <https://doi.org/10.22192/ijarbs>
- Cho, H.-B. (2009). *Molecular characterization and phylogenetics of entomopathogenic nematodes (nematoda: stienernematidae) from Asia*. (Tesis de pregrado). The University of Arizona, EE.UU.
- Ciche, T. A., & Ensing, J. C. (2003). For the insect pathogen *Photorhabdus luminescens*, which end of a nematode is out? *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 1890–1897.
- Çimen, H., Lee, M.-M., Hatting, J., Hazir, S., & Stock, S. P. (2015). *Steinernema innovationi* n. sp. (Panagrolaimomorpha: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode species from South Africa. *Journal of Helminthology*, 89(4), 415–427. <https://doi.org/10.1017/S0022149X14000182>
- Cueva, M. (2014). *Identificación taxonómica de las especies de phyllophaga (col. Scarabaeidae) presentes en diez cultivos de importancia económica en la provincia de los Ríos*. (Tesis de pregrado). Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Santo Domingo.
- De Brida, A., Rosa, J., De Oliveira, C., Castro, B., Serrão, J., Zanuncio, J., ... Wilcken, S. (2017). Entomopathogenic nematodes in agricultural areas in Brazil. *Scientific*

Reports, 7, 45254. <https://doi.org/10.1038/srep45254>

- De Ley, P., Nadler, S., Thomas, W. K., Frisse, L., Felix, M.-A., & Sternberg, P. (1999). Molecular and morphological characterisation of two reproductively isolated species with mirror-image anatomy (Nematoda: Cephalobidae). *Nematology*, 1(6), 591–612. <https://doi.org/10.1163/156854199508559>
- Dillman, A., & Sternberg, P. (2012). Entomopathogenic Nematodes. *Curr Biol*, 22(11), 430–431. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.03.047>
- Dix, I., Burnell, A., Griffin, C. T., Joyce, S. A., & Nugent, J. M. (1992). The identification of biological species in the genus *Heterorhabditis* (Nematoda: Heterorhabditidae) by cross breeding second-generation amphimictic adults. *Parasitology*, 104, 509–518.
- Ehlers, R.-U. (2005). Forum on safety and regulation. En P. S. Grewal, R.-U. Ehlers, & D. I. Shapiro-Ilan (Eds.), *Nematodes as Biocontrol Agents* (pp. 107–114). New York, USA: CABI Publishing.
- Eisenback, J. D. (1991). Preparation of nematodes for scanning electron microscopy. En W. R. Nicle (Ed.), *Manual of agricultural nematology* (pp. 87–88). New York: Marcel Dekker, INC.
- Eleftherianos, I., Joyce, S., Ffrench-Constant, R H Clarke, D. J., & Reynolds, S. E. (2010). Probing the tri-trophic interaction between insects, nematodes and *Photorhabdus*. *Parasitol*, 137, 1695–1706.
- Felsenstein, J. (1985). Phylogenies and the comparative method. *American Naturalist*, 124, 1–15.
- Fernandez, E., Arteaga, E., & Perez, M. (2017). Utilización de los nematodos entomoptógenos en el control de plagas agrícolas. <http://www.aguascalientes.gob.mx/codagea/produce/NEMA-ENT.htm>: [Recuperado el 25/05/2017]
- Filipjev, I. N. (1934). The classification of the free-living nematodes and their relations to parasitic nematodes. *Smithsonian Miscellaneous Collections*, 89, 1–63.

- Fischer, E. R., Hansen, B. T., Nair, V., Hoyt, F. H., & Dorward, D. W. (2013). Scanning Electron Microscope. *Current Protocols Microbiology*, 2, 1–76. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc02b02s25>
- Gallegos, P. (2002). Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades. En M. Pumisacho & S. Sherwood (Eds.), *El cultivo de la papa en Ecuador* (INIAP-CIP, pp. 133–134). Quito, Ecuador.
- Georgis, R., & Hague, N. G. M. (1991). Nematodes as biological insecticides. *Pesticide Outlook*, (2), 29–32.
- Gokce, C., Yilmaz, H., Erbas, Z., Demirbag, Z., & Demir, I. (2013). First Record of *Steinernema kraussei* (Rhabditida: Steinernematidae) from Turkey and Its Virulence against *Agrotis segetum* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Nematology*, 45(4), 253–259.
- Grewal, P. S., & Georgis, R. (1998). Entomopathogenic nematodes. En F. R. Hall & J. J. Menn (Eds.), *Methods in Biotechnology, vol. 5, Biopesticides: Use and Delivery* (pp. 271–299). Totowa, NJ: Humana Press.
- Gutiérrez-Gutiérrez, C., Rius, J., Cantalapiedra-Navarrete, C., Landa, B., & Castillo, P. (2011). Prevalence, polyphasic identification, and molecular phylogeny of dagger and needle nematodes infesting vineyards in southern Spain. *European Journal of Plant Pathology*, 129(3), 427–453. <https://doi.org/10.1007/s10658-010-9705-y>
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series 41*, 95–98.
- Hazir, S., Kaya, H. K., Stock, S. P., & Keskin, N. (2003). Entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for biological control of soil pests. *Turk. J. Biol*, 27, 181–202.
- Hernández, C. (2006). *Colección, patogenicidad y caracterización ecológica de nemátodos parásitos de insectos en gusano blanco (Premnotrypes vorax Hustache)*

- en Ecuador*. (Tesis de posgrado). Escuela Politécnica del Ejercito, Sangolqui, Ecuador.
- Hominick, W. M. (2002). Biogeography. En R. Gaugler (Ed.), *Entomopathogenic Nematology* (pp. 115–143). Wallingford: CABI Publishing.
- Hominick, W. M., Briscoe, B. R., Pino, E. G., Heng, J., Hunt, D. J., Kozodoy, E., ... Yoshida, M. (1997). Biosystematics of entomopathogenic nematodes : current status, protocols and definitions. *Journal of Nematology*, 71, 271–298.
- Hooper, D. J. (1988). Use of the scanning electron microscope for the identification of nematodes. En R. Fortuner (Ed.), *Nematode Identification and Expert System Technology* (pp. 301–308). New York: Plenum Press.
- Hunt, D. J. (2007a). Introduction. En *Entomopathogenic Nematodes: Systematics, Phylogeny and Bacterial Symbionts* (pp. 15–17). USA: Koninklijke Brill NV, Leiden, The Netherlands.
- Hunt, D. J. (2007b). Overview of taxonomy and systematics. En K. B. Nguyen & D. J. Hunt (Eds.), *Entomopathogenic Nematodes: Systematics, Phylogeny and Bacterial Symbionts* (pp. 27–57). USA: Koninklijke Brill NV, Leiden, The Netherlands.
- INIAP. (2004). Control del cutzo (*Phyllophaga* sp.) con *Beauveria* y *Metarhizium* sp. en el cultivo de tomate de árbol. Informe Anual del Departamento Nacional de Protección Vegetal de la Est. Exp. Santa Catalina.
- INIAP. (2006). Colección, identificación, patogenicidad y caracterización ecológica de nematodos parásitos de insectos en gusano blanco *Premnotrypes vorax* y polilla guatemalteca *Tecia solanivora* de la papa en Ecuador. Informe Anual del Departamento Nacional de Protección Vegetal de la Est. Exp. Santa Catalina.
- Ivanova, E. S., Shepeleva, N. S., & Spiridonov, S. E. (2013). Morphological and molecular characterisation of *Steinernema costaricense* Uribe-Lorío, Mora & Stock, 2007 (Panagrolaimorpha: Steinernematidae) isolate from Bush Augusta State Park, Missouri, USA. *Systematic Parasitology*, 85(3), 219–234.

<https://doi.org/10.1007/s11230-013-9424-9>

- Joyce, S. A., Reid, A. P., Driver, F., & Curran, J. (1994). Application of polymerase chain reaction (PCR) methods to the identification of entomopathogenic nematodes. En A. M. Burnell, R.-U. Ehlers, & J.-P. Masson (Eds.), *Biotechnology: Genetics of entomopathogenic nematodes-bacterium complexes* (pp. 178–187). Luxembourg: DG XII, European Commission.
- Kaushik, C., & Chaubey, A. K. (2016). Molecular characterization of *Steinernema pakistanense* (Nematoda Steinernematidae) strain isolated from India. *The Journal of Zoology*, 3(3), 22–26.
- Kaya, H. K. (1990). Soil ecology. En H. K. Kaya & R. Gaugler (Eds.), *Entomopathogenic nematodes in biological control* (pp. 93–115). Boca Raton: CRC Press.
- Kaya, H. K. (1993). Entomogenous and entomopathogenic nematodes in biological control. En K. Evans, D. L. Trudgill, & J. M. Wester (Eds.), *Plant Parasitic Nematodes in Temperate Agriculture* (pp. 565–591). Wallingford, UK: CAB International.
- Kaya, H. K., & Gaugler, R. (1993). Entomopathogenic nematodes. *Annual Review of Entomology* 38, 181–206.
- Kaya, H. K., & Stock, S. P. (1997). Techniques in insect nematology. En L. A. Lacey (Ed.), *Manual of techniques in Insect Pathology* (pp. 281–324). USA: Academic Press.
- Koppenhofer, A. M. (2007). Nematodes. En L. A. Lacey & H. K. Kaya (Eds.), *Field manual of techniques in invertebrate pathology: Application and evaluation of pathogens for control of insects and other invertebrate pests* (second ed, pp. 249–264). Dordrecht: Springer.
- Koppenhofer, H. S. (2007). Bacterial symbionts of *Steinernema* and *Heterorhabditis*. En *Entomopathogenic Nematodes: Systematics, Phylogeny and Bacterial Symbionts* (pp. 735–808). USA: Koninklijke Brill NV, Leiden, The Netherlands.

- Kuwata, R., Shigematsu, M., Yoshiga, T., Yoshida, M., & Kondo, E. (2006). Phylogenetic analyses of Japanese steinernematid nematodes and their associating *Xenorhabdus* bacteria. *Japanese Journal of Nematology*, 36(2).
- Lacey, L. A., Frutos, R., Kaya, H. K., & Vail, P. (2001). Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future? *Biological Control*, 21, 230–248. <https://doi.org/10.1006/bcon.2001.0938>
- Lacey, L. A., & Georgis, R. (2012). Entomopathogenic Nematodes for Control of Insect Pests Above and Below Ground with Comments on Commercial Production. *Journal of Nematology*, 44(2), 218–225.
- Larrea, I. (2016). La agricultura en el Ecuador. *EL UNIVERSO*, pp. 6–7.
- Lepphoto, T. (2013). *Isolation , identification and characterisation of entomopathogenic nematodes ; with a potential to be used as biological control agents of problematic insects in agricultural industries*. (Tesis de postgrado). University of the Witwatersrand Johannesburg, Sudáfrica.
- Liu, J., Berry, R. E., & Moldenke, A. F. (1997). Phylogenetic relationships of entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae) inferred from partial 18S rRNA gene sequences. *Journal of Invertebrate Pathology*, 69(3), 246–52. <https://doi.org/10.1006/jipa.1997.4657>
- Maceto, B., Becerra, D., & Rodríguez, F. (2009). Identificación molecular de un nematodo parásito de la babosa plaga *Derocera reticulatum* (müller 1774). *Revista Tumbaga*, 149–167.
- Maggiorani, A., & Gudiño, S. (2000). *Uso de nematodos entomopatógenos como una alternativa para el control de insectos plaga*. FONAIAP, Estacion Experimental de Trujillo. [http://studylib.es/doc/345755/uso-de-nematodos-entomopato-genos-como-una-alternativa: \[Recuperado el 06/02/2017\]](http://studylib.es/doc/345755/uso-de-nematodos-entomopato-genos-como-una-alternativa: [Recuperado el 06/02/2017])
- Malan, A. P., Knoetze, R., & Moore, S. D. (2011). Isolation and identification of entomopathogenic nematodes from citrus orchards in South Africa and their

- biocontrol potential against false codling moth. *Journal of Invertebrate Pathology*, 108(2), 115–125. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2011.07.006>
- Malan, A. P., Knoetze, R., & Tiedt, L. R. (2014). *Heterorhabditis noenieputensis* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae), a new entomopathogenic nematode from South Africa. *Journal of Helminthology*, 88, 139–151. <https://doi.org/10.1017/S0022149X12000806>
- Martens, E. C., Heugens, K., & Goodrich-Blair, H. (2003). Early colonization events in the mutualistic association between *Steinernema carpocapsae* nematodes and *Xenorhabdus nematophila* bacteria. *Journal Bacteriol*, 185, 3147–3154.
- Moazami, N. (2002). Biopesticide production. En *Encyclopedia of Life Support Systems*. EoLSS Publishers, Oxford, U.K.
- Morton, A. (2009). *Los nematodos entomopatógenos (Rhabditida: Steinernematidae y Heterorhabditidae) para el control del gusano cabezudo, Capnodis tenebrionis (Coleoptera : Buprestidae)*. (Tesis doctoral). Universidad Autónoma de Barcelona. España.
- Negrete, R. (2013). *Nematodos entomopatógenos procedentes de la rizosfera de suelos maiceros infestados con la gallina ciega Phyllophaga polyphylla Bates*. (Tesis de maestría). Institución de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas. Campus Montecillo. México.
- Nei, M., & Kumar, S. (2000). *Molecular evolution and phylogenetics* (Oxford, Ox).
- Nguyen, K. B. (2007). Methodology, morphology and identification. En K. B. Nguyen & D. J. Hunt (Eds.), *Entomopathogenic Nematodes: Systematics, Phylogeny and Bacterial Symbionts* (pp. 59–119). USA: Koninklijke Brill NV, Leiden, The Netherlands.
- Nguyen, K. B., Hunt, D. J., & Mráček, Z. (2007). Steinernematidae: species descriptions. En K. B. Nguyen & D. J. Hunt (Eds.), *Entomopathogenic Nematodes: Systematics, Phylogeny and Bacterial Symbionts* (pp. 270–282). USA: Koninklijke Brill NV,

Leiden, The Netherlands.

- Nguyen, K. B., & Smart, G. C. (1996). Identification of Entomopathogenic Nematodes in the Steinernematidae and Heterorhabditidae (Nemata : Rhabditida). *Journal of Nematology*, 28(3), 286–300.
- Nieto, M. G. (2010). Fundamentos en La preparación de muestras Para Microscopía Electrónica De Barrido. Tapachula, Chiapas, Mexico: ECOSUR. http://laboratorios.tap-ecosur.edu.mx/LMEB/APUNTES_MEB_CURSO_2010.pdf: [Recuperado el 28/08/2017]
- Nikdel, M., & Niknam, G. (2015). Morphological and molecular characterization of a new isolate of entomopathogenic nematode, *Steinernema feltiae* (Filipjev) (Rhabditida : Steinernematidae) from the Arasbaran forests , Iran. *Journal of Asia-Pacific Biodiversity*, 8(2), 144–151. <https://doi.org/10.1016/j.japb.2015.04.008>
- Peteira, B., Rodríguez, M., Rosales, C., & Salazar, E. (2008). Uso de técnicas moleculares en la identificación de nemátodos entomopatógenos y sus bacterias simbioses. *INIAHOY*, 2–5.
- Poinar Jr, G. O. (1990). Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. En R. Gaugler & H. K. Kaya (Eds.), *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control* (pp. 23–60). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Poinar Jr, G. O. (1993). Origins and phylogenetic relationships of the entomophilic rhabditids, Heterorhabditis and Steinernema. *Fundamental and Applied Nematology*, 16(4), 333–338.
- Poinar Jr, G. O., & Grewal, P. S. (2012). History of Entomopathogenic Nematology. *Journal of Nematology*, 44(2), 153–161.
- Powers, T. O., Todd, T. C., Burnell, a M., Murray, P. C., Fleming, C. C., Szalanski, L., ... Harris, T. S. (1997). The rDNA Internal Transcribed Spacer Region as a Taxonomic Marker for Nematodes. *Journal of Nematology*, 29(4), 441–450.

- Razia, M., & Sivaramakrishnan, S. (2014). Isolation and Identification of Entomopathogenic Nematodes of Kodaikanal Hills of South India. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 3(10), 693–699.
- Reid, A. P., & Hominick, W. M. (1992). Restriction fragment length polymorphisms within the ribosomal DNA repeat unit of British entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae). *Parasitology*, (155), 317–323.
- Robles, C. (2013). *Aislamiento, caracterización e identificación molecular de nemátodos de vida libre a partir de muestras de suelo*. (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma de Queretaro. México. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Rogg, H. (2000). Control Biológico. En *Manejo Integrado y Control Biológico de plagas y enfermedades* (PROEXANT, pp. 31–52). Quito, Ecuador.
- Rosa, J., Bonifassi, E., Amaral, J., Lacey, L. A., Simoes, N., & Laumond, C. (2000). Natural occurrence of entomopathogenic nematodos (Rhabditida: Steinernema, Heterorhabditis) in the Azores. *Journal of Nematology*, 32(2), 215–222.
- Sáenz, A. (2005). Importancia de los nematodos entomopatógenos para el control biológico de plagas en palma de aceite. *PALMAS*, 26(2), 41–57.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406–425.
- SENASA. (2016). *Tecia solanivora: una amenaza al cultivo de papa*. <http://www.senasa.gob.pe/senasacontigo/tecia-solanivora-una-amenaza-al-cultivo-de-papa/>: [Recuperado el 15/07/2017]
- Shahina, F., Manzar, H., & Tabassum, K. A. (2004). Symbiotic bacteria Xenorhabdus and Photorhabdus associated With entomopathogenic nematodes in Pakistan. *Pak. J. Nematol.*, 22(2), 117–128.
- Shapiro-Ilan, D. I., & Gaugler, R. (2002). Production technology for entomopathogenic nematodes and their bacterial symbionts. *Journal of Industrial Microbiology &*

Biotechnology, 28, 137–146.

Shapiro-Ilan, D. I., Han, R., & Dolinski, C. (2012). Entomopathogenic nematode production and application technology. *Journal of Nematology*, 44(2), 206–17.

Siddiqi, M. R. (2000). *Tylenchida Parasites of Plants and Insects* (2nd ed.). London: CABI Publishing.

Smart, G. C. (1995). Entomopathogenic nematodes for the biological control of insects. *Journal of Nematology*, 27(4S), 529–534.

Stock, S. P. (2002). New Trends in Entomopathogenic Nematode Systematics : Impact of Molecular Biology and Phylogenetic Reconstruction. En Monduzzi (Ed.), *Proceedings of the International Conference on Parasitology* (pp. 1–8). Vancouver, Canada.

Stock, S. P. (2009). Molecular approaches and the taxonomy of insect-parasitic and pathogenic nematodes. En S. P. Stock, J. Vandenberg, N. Boemare, & I. Glazer (Eds.), *Insect pathogens: Molecular approaches and techniques* (pp. 71–95). Wallingford, Oxon, England, UK: CABI Publishing.

Stock, S. P., Campbell, J. F., & Nadler, S. A. (2001). Phylogeny of *Steinernema Travassos, 1927* (Cephalobina: Steinernematidae) Inferred From Ribosomal DNA Sequences and Morphological Characters. *Journal of Parasitology*, 87(4), 877–889.

Stock, S. P., & Hunt, D. J. (2005). Morphology and systematics of nematodes used in biocontrol. En P. S. Grewal, R.-U. Ehlers, & D. I. Shapiro-Ilan (Eds.), *Nematodes as Biocontrol Agents* (pp. 3–43). Wallingford, Gran Bretaña: CABI Publishing.

Subbotin, S., Waeyenberge, L., & Moens, M. (2000). Identification of cyst forming nematodes of the genus *Heterodera* (Nematoda: Heteroderidae) based on the ribosomal DNA-RFLP. *Nematology*, 2(2), 153–164.
<https://doi.org/10.1163/156854100509042>

Swati, & Gaurav, S. S. (2015). Isolation and Molecular Characterization of

- Entomopathogenic Nematode (*Steinernema Siamkayai*). *International Journal of Science and Research*, 4(12), 2181–2187.
- Tamiru, T., Waeyenberge, L., Hailu, T., Ehlers, R.-U., Puza, V., & Mracek, M. Z. (2012). *Steinernema ethiopiense* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Ethiopia. *Nematology*, 14(6), 741–757. <https://doi.org/10.1163/156854112X627282>
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kamur, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetic analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725–2729.
- Technelysium, P. (2016). Chromas. Australia: Technelysium.
- Urbano, G. J. (2003). *Galleria mellonella* Linnaeus, 1758 (LEPIDOPTERA: GALLERIINAE), parasito de *Apis mellifera* ibérica Linnaeus (HYMENOPTERA: APIDAE). *Boletín de la SAE No7*: 27-27.
- Uribe-lorío, L., & Stock, S. P. (2007). *Steinernema costaricense* n. sp. and *S. puntauense* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), two new entomopathogenic nematodes from Costa Rica. *Systematic Parasitology*, 68, 167–182. <https://doi.org/10.1007/s11230-007-9098-2>
- Van Bezooijen, J. (2006). *Methods and techniques for nematology*. Wageningen: Wageningen University.
- Vasquez, E. (2012). “*Caracterización de nemátodos entomopatógenos aislados del Valle de Guasave, Sinaloa, México*”. (Tesis de maestría). Instituto Politecnico Nacional, Sinaloa, México.
- Woodring, J. L., & Kaya, H. K. (1988). *Steinernematid and heterorhabditid nematodes: a handbook of biology and techniques*. Southern Cooperative Series Bulletin 33: Arkansas Agricultural Experiment Station, Fayetteville, AR.
- Wouts, W. M. (1991). *Steinernema* (Neoplectana) and *Heterorhabditis* species. En W. R.

- Nicle (Ed.), *Plant and Insect Nematodes* (pp. 855–897). New York, EE.UU: Marcel Dekker.
- Wouts, W. M., Mracek, M. Z., Gerdin, S., & Bedding, R. A. (1982). *Neoaplectana* Steiner, 1929 a junior synonym of *Steinernema* Travassos, 1927 (Nematoda: Rhabditida). *Systematic Parasitology*, 4, 147–154.
- Zhou, W., Apkarian, R., Wang, Z., & Joy, D. (2007). Fundamentals of Scanning Electron Microscopy. En W. Zhou & Z. Wang (Eds.), *Scanning Microscopy for Nanotechnology* (pp. 1–40). USA, New York :Springer.
- Zyl Van, C., & Malan, A. P. (2014). The Role of Entomopathogenic Nematodes as Biological Control Agents of Insect Pests, with Emphasis on the History of Their Mass Culturing and in vivo Production. *African Entomology*, 22(2), 235–249. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4001/003.022.0222>