Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional
Unidad Mérida

Departamento de Recursos del Mar

"Caracterización de asociaciones entomopatógenas como alternativa para el control biológico de larvas del mosquito *Aedes aegypti* en el Estado de Yucatán, México"

Tesis que presenta:

Mariana Beatriz Ávila López

Para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias

En la especialidad de:

Ciencias Marinas

Directores de Tesis:

Dr. Víctor Manuel Vidal Martínez
Dr. José Quinatzin García Maldonado

Mérida, Yucatán, México Marzo de 2023

RESUMEN

El control biológico mediante nemátodos entomopatógenos (NEPs) ha demostrado un buen potencial para contribuir al control integral de las larvas del mosquito *Aedes aegypti*, que en su etapa adulta son vectores de enfermedades como Dengue, Zika y Chikungunya. Sin embargo, hasta el momento no hay registros de la presencia de NEPs ni de su capacidad infectiva contra insectos plaga en el estado de Yucatán, al sur de México. Los objetivos del presente estudio fueron: 1) reportar la diversidad de NEPs presentes en muestras seleccionadas de suelo yucateco, 2) determinar la capacidad infectiva de estos nemátodos contra larvas de mosquito *Ae. aegypti* y 3) identificar la comunidad microbiana presente en *Ae. Aegypti* muertas por la exposición con NEPs. Los nemátodos fueron colectados mediante la técnica de trampas para insectos utilizando a la polilla de la cera *Galleria mellonella*. Para la identificación de los nemátodos aislados se realizó taxonomía clásica y molecular a través del espaciador transcrito interno (ITS), el gen 28S del ADN ribosomal y análisis filogenéticos. Para los bioensayos se probaron cuatro concentraciones de NEPs: 1260 juveniles infectivos (JIs) por 1 larva de mosquito, 2520 JIs:1, 3780 JIs:1 y 5040 JIs:1. Se utilizó la secuenciación de alto rendimiento del gen 16S ARNr para identificar secuencias del amplicón bacteriano en las larvas de mosquito infectadas con NEPs. Dentro de los resultados se recuperaron; *Heterorhabditis indica*, *Heterorhabditis* n. sp. y *Metarhabditis rainai* de muestras de suelo. Los tres nemátodos se reportan por primera vez para el estado de Yucatán, México. La concentración de 2520 JIs:1 produjo el 80% de la mortalidad de larvas de mosquito en 48 h. Los miembros bacterianos representativos del género *Photorhabdus* fueron numéricamente dominantes (74 %) en las larvas de mosquito infectadas por *H. indica*. Por otro lado, se reporta la infección mixta entre una especie de NEP y un nemátodo bacteriófago de vida libre en larvas de *Galleria mellonella*, lo que revela una fuerte competencia intragremial al compartir un recurso alimenticio en común. El nemátodo bacteriófago *M. rainai* fue clasificado como un cleptoparásito facultativo, dado que robó los recursos alimenticios previamente procesados por los NEPs, afectando directamente su ciclo de vida al tener que detener su desarrollo para salir en busca de un nuevo hospedero.

ABSTRACT

Biological control using entomopathogenic nematodes (EPNs) has demonstrated good potential to contribute to the integral control of *Aedes aegypti* mosquito larvae, which as adults are vectors of diseases such as Dengue fever, Zika and Chikungunya. However, until now there are no records of the presence of EPNs or their infective capacity to kill insect plagues in Yucatán, southern México. The objectives of the current study were: 1) to report the entomopathogenic nematodes present in selected samples of Yucatecan soils, 2) to determine the infective capacity of these nematodes against *Ae. aegypti* mosquito larvae and 3) to identify the microbial community present in *Ae. aegypti* killed by exposure to EPNs.The nematodes were collected by the insect trap technique using the great wax moth *Galleria mellonella*. To identify the EPNs, classical and molecular taxonomy based on the internal transcribed spacer (ITS), 28S gene of ribosomal DNA and phylogenetic analysis were used. For the bioassays to determine the infectivity of the nematodes, four concentrations of the most frequent and abundant EPN were tested: 1260 infective juveniles (IJs) per 1 mosquito larvae, 2520 IJs:1, 3780 IJs:1 and 5040 IJs:1. High-throughput sequencing of the 16S rRNA gene was used to identify bacterial amplicon sequences in the mosquito larvae infected with EPNs. *Heterorhabditis indica*, *Heterorhabditis* n. sp. and *Metarhabditis rainai* were isolated and reported for first time for Yucatán, México. The concentration of 2520 IJs:1 produced 80% of mosquito larvae mortality in 48 h. Representative members of *Photorhabdus* genus were numerically dominant bacteria (74%) in mosquito larvae infected by *H. indica*. On the other hand, mixed infection between a EPN species and a free-living bacteriophage nematode in *G. mellonella* larvae is reported, revealing strong intraguild competition by sharing a common food resource. The bacteriophage nematode *M. rainai* was classified as a facultative kleptoparasite, since it steals resources previously processed by EPNs, affecting their life cycle by stoping development and pushing for searching of a new host.

DEDICATORIA

A mi pequeña pero bonita familia; Julián, Nicolás, David, Lucho, Susana y Ricardo.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Víctor M. Vidal Martínez por sus enseñanzas, paciencia y guía durante los ultimos 12 años de mi formacion academica. Por que sus enseñanzas perduraran en mi toda la vida. Tener un gran mentor es esencial para ir más lejos.

Al Dr. Jose Q. García Maldonado por su tutoria y confianza en este trabajo.

Al Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Mérida y en especial al Departamento de Recursos del Mar.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado durante todo el doctorado, con el número de beca 340012.

A la Dra. Leopoldina Aguirre Macedo por sus comentarios y acertadas sugerencias para la realización de este trabajo.

Al Dr. Jorge E. Ibarra Rendon, por sus valiosos comentarios en la revisión de esta tesis y por abrirme las puertas de su laboratorio para mi entrenamiento.

Al Dr. Héctor Estrada Medina por sus aportaciones y experiencia compartida para el analisis de muestras de suelo.

Al Dr. Emanuel Hernández Núñez por su asesoria y correcciones para la elaboración de este trabajo.

Al Staff del laboratorio de Patología Acuática que me apoyaron en los experimentos realizados en campo y laboratorio: Paco, Arturo, Nadia, Abril y Johnny.

Al laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de Naresuan, Phitsanulok, Tailandia, principalmente Aj. Pek Dr. Apichat Vitta y Dra. Aunchalee Thanwisai por su hospitalidad y enseñanzas durante mi estancia, **ขอบคุณ**

A mi familia y a Dios.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN..... I
ABSTRACT.....II
DEDICATORIA.....III
AGRADECIMIENTOS.....IV
TABLA DE CONTENIDO.....V
LISTA DE FIGURAS..... VI
LISTA DE TABLAS IX
I. INTRODUCCIÓN GENERAL..... 1

II. BIOPROSPECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE NEMÁTODOS ENTOMOPATÓGENOS EN EL ESTADO DE YUCATÁN.....35
INTRODUCCIÓN 35
HIPÓTESIS 36
OBJETIVO.....36
MATERIALES Y MÉTODOS..... 37
RESULTADOS 39
DISCUSIÓN..... 62
CONCLUSIONES 67

III. CAPACIDAD INFECTIVA Y COMPOSICIÓN DE LA COMUNIDAD MICROBIANA DE NEMÁTODOS ENTOMOPATÓGENOS DE YUCATÁN.....68
INTRODUCCIÓN 68
HIPÓTESIS 69
OBJETIVO.....69
MATERIALES Y MÉTODOS.....70
RESULTADOS 72
DISCUSIÓN.....74
CONCLUSIONES 76

IV.COMPOSICIÓN BACTERIANA DE LARVAS DE *Aedes aegypti* EN POST-INFECCIÓN CON NEPs.....77
INTRODUCCIÓN 77
HIPÓTESIS 77
OBJETIVO..... 77
MATERIALES Y MÉTODOS.....79
RESULTADOS 81
DISCUSIÓN 85
CONCLUSIONES 87

V. DISCUSIÓN GENERAL 88
CONCLUSIONES GENERALES 96
BIBLIOGRAFÍA.....98

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de flujo de la estrategia de investigación……**5**

Figura 2. Ciclo de vida de NEPs dentro del hospedero 1) los juveniles infectivos (Jis) entran a un hospedero por orificios naturales, ano o espiráculos; 2) los JIs liberan su simbionte bacteriano en el hemocele provocando la muerte del hospedero; 3) el nemátodo se reproduce hasta agotar los recursos del hospedero; 4) agotados los recursos, los JIs migran en busca de otro hospedero (tomado de Dillman et al. 2012) ……..**8**

Figura 3. Etapas de desarrollo de los nemátodos entomopatógenos (NEPs) dentro del hospedero. A-Los nemátodos entran en el insecto huésped; B, C- Hembra de primera generación de Steinernematidae; D- Hembra hermafrodita de primera generación de Heterorhabditidae; E, F-Hembra y macho de segunda generación de Steinernematidae; G, H-Segunda generación de hembras y machos anfimícticos de Heterorhabditidae; I, J-Estadio juvenil infeccioso (IJ) de Heterorhabditidae y Steinernematidae (modificado de Sharma et al., 2021) ……..……..**9**

Figura 4. Características morfológicas del género *Steinernema* en vista lateral. A) todo el cuerpo D) Espícula y E) cola de macho de primera generación; B) la región anterior F), epiptygma y G) cola de la hembra de primera generación; C) la región anterior y H) la cola del juvenil infectivo. Barras de escala (en µm): A = 320; B = 100; C = 32; D = 32; E = 65; F = 78; G = 28 y H = 90 (Tomado de Qiu et al., 2011) ……..…**13**

Figura 5. Características morfológicas del género *Heterorhabditis*. *Heterorabditis floridensis* n. sp. A, B: Regiones anterior y posterior de un hermafrodita; C: Región anterior de un macho; D: Región posterior de un macho mostrando espícula en vista lateral; E: Región posterior de un macho en vista ventral mostrando espículas, ala caudal y papilas; F: Región anterior de un juvenil infectivo; G: Cola de un juvenil infectivo envainado que muestra el extremo de la cutícula de la segunda etapa y el juvenil de la tercera etapa. Barras de escala: A-E = 50 µm, F, G = 15 (Nguyen et al., 2006) ……..…**15**

Figura 6. Estados de la república mexicana donde se han aislado NEPs (recopilación de información de colectas realizada por diversos autores) ……..…**21**

Figura 7. Mapa del estado de Yucatán que muestra los sitios muestreados en busca de nemátodos entomopatógenos……..…**31**

Figura 8. Apiario de *Apis mellifera* en Peto, Yucatán donde se revisaron las colmenas para la colecta de larvas de *G. mellonella*……**32**

Figura 9. Figura 9. Estados de desarrollo de la polilla de la cera (*G. mellonella*) en el tiempo; A) huevos, B) larvas que se desarrollan hasta en 8 estadios larvales, C) pupas y D) adulto……..……..**33**

Figura 10. Tiempos de infección de larvas *G. mellonella* en muestras de suelo colectadas para la obtención de NEPs……..**34**

Figura 11. Mapa de sitios de suelos en localidades del estado de Yucatán. Los puntos de recogida están señalizados según la presencia o ausencia de EPN. Los sitios de muestreo marcados con rojo denotan ausencia de EPN, mientras que los sitios de muestreo marcados con azul, amarillo y morado fueron positivos para NEPs…….**40**

Figura 12. *Heterorabditis* n. sp. Fotografías SEM. A, Cabeza de hembra amfimíctica con seis papilas labiales y dos anfidios (aumento 5000x); B, Región posterior de nemátodo hermafrodita que muestra el área anal y la punta de la cola (aumento de 2500x); C, Región anterior del nemátodo hermafrodita donde se observa el poro excretor (aumento 1.000x); D, juvenil infectivo con diente larvario y cutícula estriada del segundo estadio (aumento 5,000x); E. Región vulvar protuberante ubicada en la parte media del nemátodo hermafrodita (aumento 5.000x); F, Región anterior de un nemátodo envainado que muestra el cuerpo con un patrón teselado (aumento de 5000x)…….**49**

Figura 13. Relaciones filogenéticas de especies del género *Heterorhabditis* utilizando el método de máxima verosimilitud para generar los árboles filogenéticos. El árbol muestra ITS en el lado izquierdo y 28S en el lado derecho……**54**

Figura 14. Micrografias SEM de *Metarhabditis rainai* de macho. A, región posterior, vista lateral, papilas bursales con pequeñas papilas bifurcadas, B, vista ventral que muestra dos pares de pequeñas papilas en el borde posterior de la cloaca y las espículas (Micrografías realizadas en el SEM del instituto de Biología, UNAM) ……**57**

Figura 15. Micrografía de luz clara. Vista ventral del ejemplar macho de *Metarhabditis rainai* que muestra ocho papilas bursales……**58**

Figura 16. Relaciones filogenéticas de especies del género *Metarhabditis* utilizando el método de máxima verosimilitud para generar los árboles filogenéticos……**59**

Figura 17. Relaciones filogenéticas de especies del género *Heterorhabditis* utilizando el método de máxima verosimilitud para generar los árboles filogenéticos. En el lado izquierdo se muestra el árbol obtenido con ITS y en el lado derecho el árbol resultante con 28S. Las secuencias recién generadas están resaltadas en rojo. Los números cerca de los nodos del árbol representan los valores de soporte de arranque y la barra de escala indica el número de sustituciones por sitio……**61**

Figura 18. Ciclo de vida del nemátodos del género *Heterorhabditis* dentro de larva *G. mellonella.* La imagen explica paso a paso los cambios de estadio del nemátodo desde la entrada al hospedero, haciendo énfasis en el estadio L3, ya que, si hay suficientes recursos dentro del hospedero, el nemátodo continua con su ciclo. De lo contrario, entra a la fase de recuperación donde detiene su desarrollo en L3 para salir en busca de otro hospedero..**65**

Figura 19. Metodología para la eclosión inducida de huevecillos de *Ae. Aegypti* mediante una bomba al vacío (Metodología estandarizada en el laboratorio de Bioinsecticidas del CINVESTAV, unidad Irapuato)……**71**

Figura 20. Curvas de supervivencia general de Kaplan-Meier que comparan la mortalidad de larvas de *Aedes aegypti* después de la exposición a juveniles infecciosos de *Heterorhabditis indica*. El control no contenía juveniles infecciosos. Las unidades de tratamiento fueron el número de juveniles infectantes de *H. indica* por larva de mosquito. Cada tratamiento tenía 10 larvas de mosquito……**73**

Figura 21. Abundancia relativa de bacterias presentes en las larvas de *G. mellonella* infectadas con *Heterorhabditis indica*. Los colores representan la diversidad bacteriana de los géneros presentes en las larvas……**83**

Figura 22. Abundancia relativa de bacterias presentes en las larvas de *Aedes aegypti* infectadas con *Heterorhabditis indica*. Los colores representan la diversidad bacteriana de los géneros presentes en las larvas de mosquito. Las siglas fueron las siguientes: C-Larva: larvas de mosquito del tratamiento de control sin nemátodos; T2-Larva: larva de mosquito del tratamiento dos (2520 juveniles infectivos de *H. indica* por larva de mosquito) ……**84**

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Lista de especies descritas del género *Xenorhabdus* y de su nemátodo simbionte (Tomado de Sajnaga y Kazimierczak, 2020) ……**17**

Tabla 2. Lista de especies descritas del género *Photorhabdus* y de su nemátodo simbionte (Tomado de Sajnaga y Kazimierczak, 2020) ……**18**

Tabla 3. Nemátodos entomopatógenos (NEPs) utilizados contra plagas agrícolas en bioensayos bajo condiciones de laboratorio ……..…….**24**

Tabla 4. Nemátodos entomopatógenos (NEPs) utilizados contra larvas de mosco en bioensayos bajo condiciones de laboratorio ……**26**

Tabla 5. Proteínas que codifican toxinas por las bacterias simbiontes, con capacidad insecticida (Hinchliffe et al, 2010; Sergeant et al, 2003) ……**28**

Tabla 6. Media de los parámetros del suelo medidos con presencia y ausencia de NEPs del estado de Yucatán……**42**

Tabla 7. Diferencia entre las medias de los parámetros de muestras de suelo con presencia y ausencia de NEPs……**43**

Tabla 8. Morfometría de *Heterorhabditis* n. sp. de Tikuch, Yucatán. Medidas en µm de la siguiente forma: promedio ± D.S. (rango)……**.46**

Tabla 9. Morfometría del juvenil infectivo *Heterorhabditis* en comparación con otras especies de *Heterorhabditis*. Medidas en µm de la siguiente forma: promedio ± D.S. (rango)……**.48**

Tabla 10. Distancias genéticas entre *Heterorhabditis kaankabi* n. sp. y las especies de *Heterorhabditis* en los genes ribosómicos 28S e ITS. p= distancias p no corregidas, N= número de nucleótidos diferentes (na= secuencias no disponibles en Genbank) ……**.53**

Tabla 11. Morfometría de *Metarhabditis rainai* de Tikuch, Yucatán. Medidas en µm de la siguiente forma: media ± D.S. (rango)……**56**

Tabla 12. Valores porcentuales de supervivencia de larvas de mosquito *Aedes aegypti* expuestas a nemátodos entomopatógenos *Heterorhabditis indica*. Las siglas fueron las siguientes: SE = error estándar; IC del 95 % para la media = intervalos de confianza (IC) del 95 % para el control y los tratamientos (T1-T4); l/JIs = larvas de mosquitos/juveniles infectivos……**.73**

Tabla 13. Dosis letal media (DL50) de *H. indica* contra larvas de mosquitos en tercer estadio a diferentes tiempos de exposición……**74**

Tabla 14. Búsqueda BLAST basada en 16S del simbionte bacteriano de *H. indica* recolectado en Dzan……..**82**

I.INTRODUCCIÓN GENERAL

Los mosquitos forman parte de los artrópodos que pueden transmitir una gran variedad de patógenos y parásitos que causan enfermedades de importancia médica. Actualmente, existen más de 4,500 especies de mosquitos en el mundo que están agrupados en 34 géneros dentro de la familia Culicidae (Chandra et al., 2013). Dengue, Zika y Chikungunya, son tres arbovirosis transmitidas por mosquitos del género *Aedes* de zonas tropicales y subtropicales (Kovendan et al., 2018). Diversos factores como el crecimiento demográfico sin precedentes (principalmente en los centros urbanos de los países tropicales), el aumento del movimiento de mercancías y personas ha ocasionado la expansión del rango de estos vectores provocando un aumento alarmante de la propagación de *Ae. aegypti* (MacKenzie et al., 2004).

El uso indiscriminado de plaguicidas químicos ha generado resistencia a insectos plaga, brotes de plagas secundarias, riesgo de seguridad para humanos y animales, así como la contaminación de las aguas subterráneas y disminución de la biodiversidad (Wahengbam et al., 2018). Debido a esto, se han impulsado estrategias de control biológico para suprimir poblaciones de organismos plaga por medio de sus enemigos naturales. Dentro del control biológico de insectos vectores se contempla el uso de organismos microbianos que incluye bacterias, hongos, virus, protozoarios y nemátodos entomopatógenos (NEPs) (Nawaz et al., 2016). Uno de los grupos que ha recibido atención por sus estrategias para parasitar insectos son los NEPs. A pesar de que ocho familias de nemátodos tienen potencial para matar insectos, no todos se clasifican como entomopatógenos. Actualmente, este término recae sobre tres familias: Mermithidae, Steinernematidae y Heterorhabditidae (Gaugler y Kaya, 1990). Sin embargo, se han observado algunas desventajas de usar mermítidos en control biológico de insectos plaga. Por ejemplo, *Romanomermis culicivorax* tiene dificultad al penetrar el tegumento de las larvas de mosquito más viejas (Peterson y Willis, 1970). En el caso de nemátodos pertenecientes a las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae, su capacidad

infectiva contra insectos plaga está basada en su relación simbionte con bacterias de los géneros *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* respectivamente.

Durante el ciclo de vida de los NEPs, el juvenil infectivo (JI) penetra al hospedero a través de orificios naturales como boca, ano y espiráculos. En el caso de heterorhabditidos, lo hace con la ayuda de una estructura quitinosa que simula un diente larval. Una vez dentro del hospedero, los juveniles infectivos migran al hemocele donde liberan su simbionte bacteriano (Bedding et al., 1993). La bacteria produce metabolitos secundarios con actividad citotóxica, antimicrobiana, antiparasitaria e insecticida que causan septicemia al hospedero en un periodo de 24 a 48 horas después de la infección (Bode, 2009).

Los NEPs se alimentan de tejidos de los hospederos y se reproducen hasta por tres generaciones hasta agotarse los recursos. Entonces, los JI de vida libre migran en busca de otro hospedero susceptible al cual parasitar (Akhurst, 1993). A la fecha, se han descrito alrededor de 100 especies de *Steinernema* y 21 especies de *Heterorhabditis* alrededor del mundo, de las cuales 16 fueron descritas en América Latina (12 *Steinernema* y 4 *Heterorhabditis*) (Shapiro-Ilan et al., 2018). Los NEPs han sido probados en más de 170 especies de importancia agrícola y plagas urbanas de importancia medica (Chitra et al., 2017).

Recientemente, se han aislado cepas de *Steinernema siamkayai*, *Heterorhabditis indica*, *Steinernema glaseri* y *Steinernema abbasi* los cuales fueron evaluados para probar su capacidad infectiva contra larvas de *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* y *Culex quinquefasciatus* (Dilipkumar et al., 2019).

El estudio de la diversidad de NEPs en México está limitada a unas pocas regiones en suelos cultivados y no cultivados, por lo que existen escasos reportes de NEPs locales. Por ejemplo, *Heterorhabditis mexicana*, *Steinernema carpocapsae* y *Steinernema feltiae* han sido reportados en suelos de Oaxaca (Girón, 2012). En Sonora, se aisló *Heterorhabditis sonorensis* de ninfas de *Diceroprocta ornea* (Homoptera: Cicadidiae) en cultivos de espárragos (Stock, Rivera-Orduño, y Flores-Lara, 2009). La mayor diversidad de NEPs aislados en México, han sido probados contra plagas de importancia agrícola. (Stock, Rivera-Orduno, y Flores-Lara, 2009;

Salgado-Morales et al., 2019). Además, los avances científicos están basados en el aislamiento e identificación de nemátodos y su simbionte bacteriano mediante caracteres morfológicos, morfométricos y herramientas moleculares avanzadas. Sin embargo, todas estas pruebas se quedan en laboratorio sin dar el siguiente paso a las pruebas de campo para evaluar su efecto con factores bióticos y abióticos.

Por otro lado, la relación monoxénica entre *Steinernema-Xenorhabdus* y *Heterorhabditis-Photorhabdus* ha sido constantemente probada (Eivazian, Mohammadi, y Girling, 2017). No obstante, se han reportado bacterias como *Providencia* sp., *Ochrobactrum* sp., *Pseudomonas* sp. y *Alcaligenes faecalis* que han sido aisladas de NEPs, sin una comprensión clara de su papel en tales interacciones (Jackson et al., 1995; Babic et al., 2000; Gouge y Snyder, 2006). En insectos, la mayoría de los estudios de microbiota se han basado en la composición bacteriana intestinal o hemolinfa de insectos infectados (Engel y Moran, 2013). De hecho, se han encontrado asociaciones diaxénicas de bacterias no canónicas como *Pseudomonas aeruginosa* en los IJ de diferentes generaciones de *H. indica*, favoreciendo la infección de hospederos como *Galleria mellonella*, *Tenebrio molitor*, *Heliothis subflexa* y *Diatraea magnifactella* cuando se combinaron con *Photorhabdus luminescens* (Salgado-Morales et al., 2019).

El aislamiento e identificación de complejos nemátodo/bacteria nativos del estado de Yucatán, podría promover el uso y desarrollo de estos organismos como agentes de control biológico en la región. Principalmente porque son especies adaptadas a las características del suelo como nutrientes, pH, textura y humedad dependiendo de los distintos usos de suelo de una región (Alekseev et al., 2006; Kanga et al., 2012). La península de Yucatán tiene una superficie territorial de 39,340 km^2 con un clima cálido-subhúmedo y temperatura media anual de 26ºC donde predominan las selvas secas subhúmedas (INEGI, 2015). La mayor parte de la península lo conforma una llanura que se formó como producto de la aparición de una plataforma marina compuesta por roca calcárea (que contiene cal). Por estas razones es de sumo interés conocer los NEPs adaptados localmente, ya que difiere de los de otras regiones del país por ser una placa cárstica, lo que le confiere características

particulares que podria determinar su diversidad nematológica. En este trabajo se realizaron colectas de suelo a escala regional en los diferentes usos de suelo que predominan en el estado (agricultura, ganadería, conservacionista y silvícola) para conocer la diversidad de NEPs bajo distintas condiciones.

Justificación

En México la información con respecto a la identificación y distribución de nemátodos entomopatógenos nativos es limitada. Por esta razón, el conocer la diversidad de los complejos nemátodo/bacteria entomopatógena localmente adaptados a nivel regional, permitiría la selección de aislamientos promisorios con mayor patogenicidad para ser utilizados en control biológico de plagas. El uso de estos aislamientos permitiría su evaluación en el control de vectores (como los mosquitos) y por tanto, en la prevencion de enfermedades vectoriales como el dengue. Esto contribuiría a romper el ciclo de vida del vector *Ae. aegypti* y a aislar los componentes biocidas con miras al desarrollo de bioinsecticidas.

Hipótesis

En la peninsula de Yucatán existen complejos nemátodo/bacteria con potencial entomopatógeno, especificamente aquellos que pueden matar a las larvas de *Ae. aegypti.*

Objetivo

Explorar y caracterizar la diversidad del complejo nemátodo/bacteria nativos del estado de Yucatán, y poner a prueba su patogenicidad en larvas de *Ae. aegypti.*

Estrategia de Investigación

La presente investigación está compuesta por cinco capítulos. El primer capítulo se divide en introducción y metodología general. En el capítulo dos se aborda la diversidad de NEPs aislados en distintas localidades del estado de Yucatán. En el capítulo tres se describen los resultados de las infecciones experimentales de los nemátodos aislados para conocer su capacidad infectiva contra larvas de *Ae.*

aegypti expuestas a diferentes concentraciones. Después de la infección, el objetivo fue identificar las bacterias que estuvieron presentes en la interacción nemátodo-hospedero, lo cual se abordó en el capítulo cuatro. Por último, en el capítulo cinco se discutieron todos los resultados para poder integrarlos a una conclusión principal (Figura 1).

Figura 1. Diagrama de flujo de la estrategia de investigación.

MARCO DE REFERENCIA CONCEPTUAL

Control biológico

El uso intensivo e imprudente de plaguicidas químicos para controlar insectos ha tenido como resultado efectos adversos en salud humana, animal y en componentes bióticos y abióticos en los ecosistemas (Wahengbam et al, 2018). Inicialmente, sólo los ambientalistas protestaron contra el uso de plaguicidas, donde el trabajo de Rachel Carson titulado “Primavera silenciosa” publicado en 1962 fue el pionero en este tema. Con el fin de buscar estrategias para controlar insectos de una forma efectiva y amigable al medio, surge el control biológico, el cual se define como el uso de organismos vivos utilizados para suprimir o controlar poblaciones de organismos plaga (Lacey, 2015). El control biológico se clasifica en tres tipos: 1) clásico, que tiene como objetivo introducir enemigos naturales útiles (principalmente importados) en el área de la plaga para que se establezcan de forma permanente (Hoy, 2008a); 2) aumentativo, es la liberación periódica de un enemigo natural y se subdivide en dos tipos: inundativo e inoculativo, en ambos se colecta, se cria y se libera el organismo benéfico. La diferencia es que en el primero se liberan grandes cantidades de enemigos naturales para la reducción inmediata de la plaga. En el segundo, la liberación es periódica en intervalos de tiempos largos (6 a 12 meses) para obtener un control duradero y la acumulación de la población de enemigos naturales (Hoy, 2008b); 3) por conservación, esta estrategia se define como la modificación del medio o las prácticas existentes para proteger y potenciar enemigos naturales. La abundancia y diversidad de enemigos naturales aumenta en respuesta a una variedad de medidas de conservación como el proporcionar polen, refugios, presas y hospederos alternativos a los enemigos naturales (Begg, 2017). México ha sido muy activo en el desarrollo del control aumentativo, principalmente por la liberación de la avispita *Trichogramma* y otros parasitoides para el manejo de lepidópteros en cultivos como maíz, café, tabaco, cítricos, ornamentales y caña de azúcar cubriendo más de 1.5 millones de hectáreas (Van Lenteren y Bueno, 2003).

Los organismos utilizados como controladores biológicos se dividen en dos grupos: los agentes de control biológico de invertebrados (parasitoides y depredadores) y los agentes de control biológico microbiano como bacterias, virus, hongos, protozoarios y nemátodos (donde la palabra “agente” bajo un contexto biológico se define como un organismo presente en el ambiente que puede producir enfermedad). La lista de agentes de control biológico microbiano incluye alrededor de 100 especies de bacterias, más de 800 especies de hongos, 1,000 especies de protozoarios, 1,000 virus y nemátodos de distintas familias que afectan a casi 525 especies de insectos, entre otros (Nawaz et al., 2016; Koul 2007).

Nemátodos entomopatógenos

Una gran diversidad de especies de nemátodos que pertenecen a más de 30 familias están asociadas con insectos y otros invertebrados como ácaros y moluscos (Poinar, 1979; Kaya y Stock, 1997). De estas, ocho familias han recibido mayor interés debido a su potencial como agentes de control biológico de insectos: Mermithidae, Tetradonematidae, Allantonematidae, Phaenopsitylenchidae, Sphaerulariidae, Rhabditidae, Steinernematidae y Heterorhabditidae (Kaya y Stock, 1997). Sin embargo, se han encontrado ciertas limitaciones en el uso de nemátodos de algunas familias. Por ejemplo, a pesar del éxito que han tenido los mermítidos infectando larvas de mosquitos, se encontró que son intolerantes a los hábitats contaminados o con alta salinidad. Además, sólo pueden producirse *in vivo* dejándolos en desventaja comercial con *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. En la actualidad, la mayoría de las investigaciones recae sobre nemátodos de las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae. Steinernematidae se dividen en dos géneros: *Steinernema* (con 100 especies) y *Neosteinernema* (con solo una especie: *N. longicurvicauda*) (Malan y Ferreira, 2017). La familia Heterorhabditidae sólo tiene un género, *Heterorhabditis*, con veinte especies identificadas (Malan y Ferreira, 2017). El término “entomopatógeno” se utiliza en parasitología y patología para referirse a microorganismos y virus que son capaces de causar enfermedades a un insecto hospedero. En el grupo de los nemátodos, este término ha recaído en dos

familias Steinernematidae y Heterorhabditidae que son vectores de bacterias que pertenecen a los géneros *Xenorhabdus* y *Photorhabdus*, respectivamente (Gaugler y Kaya, 1990). Dillman et al. (2012) propusieron criterios basados en principios fundamentales del estilo de vida de los ya clasificados NEPs *Steinernema* y *Heterorhabditis* para determinar si un nemátodo debe ser considerado entomopatógeno 1) los nemátodos deben estar asociados con bacterias para facilitar la patogénesis (su relación puede no ser obligada, pero no debe de ser transitoria), 2) estrategias de búsqueda y penetración activa al hospedero por parte de los juveniles infectivos (JIs), 3) liberación de la bacteria en el hemocele del hospedero, 4) muerte rápida del hospedero (entre 24 y 48 horas), proliferación bacteriana y reproducción de nemátodos, 5) recuperación de las bacterias patógenas por los JIs y 6) migración de JIs del cadáver del hospedero en busca de otro hospedero (Figura 2 y 3).

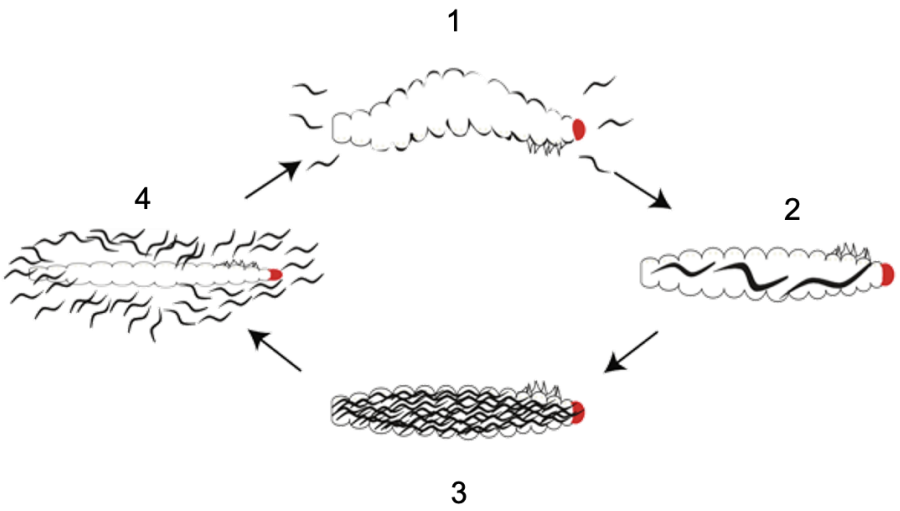

Figura 2. Ciclo de vida de NEPs dentro del hospedero 1) los JIs entran a un hospedero por orificios naturales, ano o espiráculos; 2) los JIs liberan su simbionte bacteriano en el hemocele provocando la muerte del hospedero; 3) el nemátodo se reproduce hasta agotar los recursos del hospedero; 4) agotados los recursos, los JIs migran en busca de otro hospedero (tomado de Dillman et al. 2012).

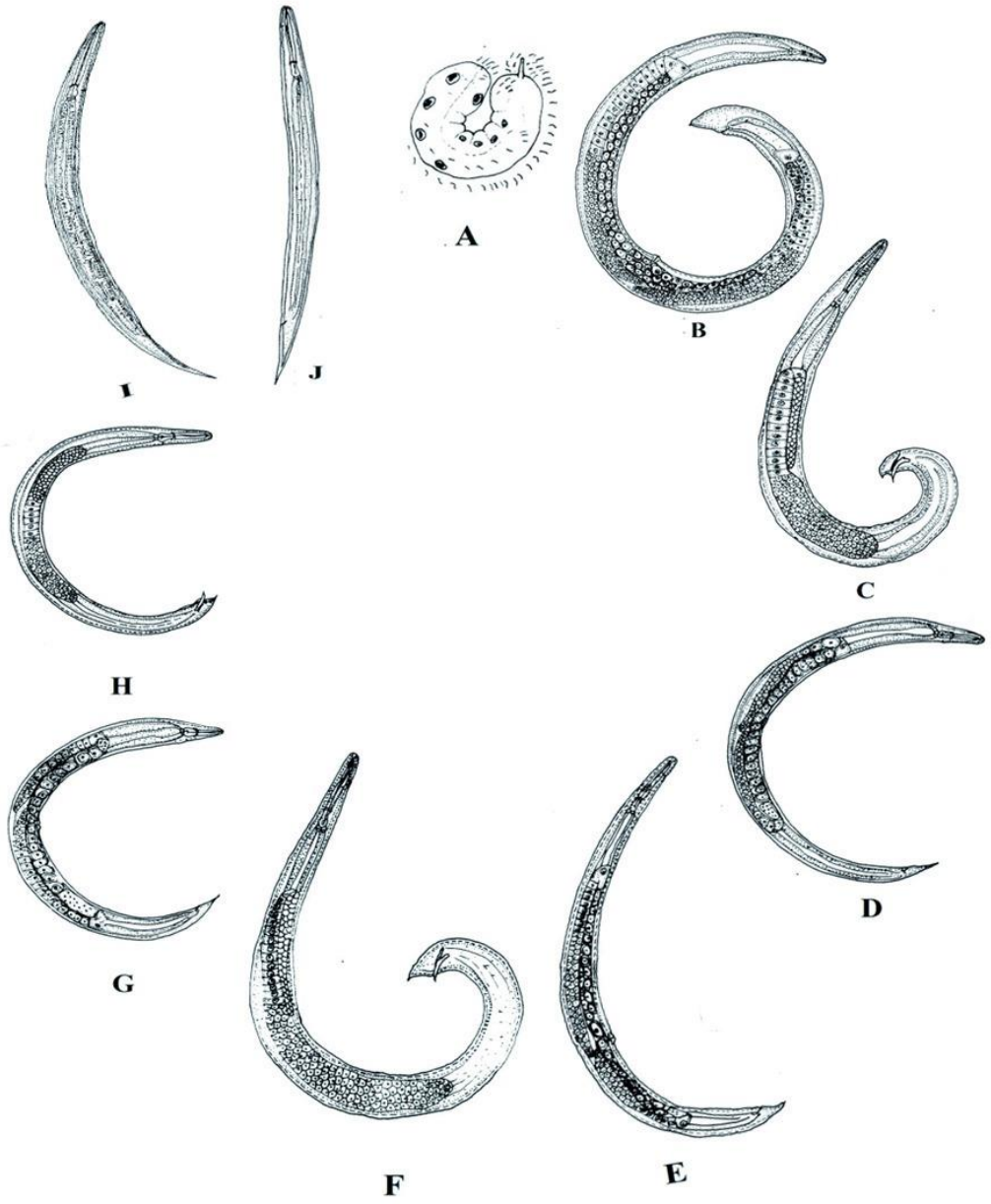

Figura 3. Etapas de desarrollo de NEPs dentro del hospedero. A-Los nemátodos entran en el insecto huésped; B, C- Hembra de primera generación de Steinernematidae; D- Hembra hermafrodita de primera generación de Heterorhabditidae; E, F-Hembra y macho de segunda generación de Steinernematidae; G, H-Segunda generación de hembras y machos anfimícticos de Heterorhabditidae; I, J-Estadio juvenil infeccioso (IJ) de Heterorhabditidae y Steinernematidae (modificado de Sharma et al., 2021).

Por otro lado, evidencia reciente sugiere que la entomopatógenia puede no ser un estilo de vida exclusivo de las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae. Por ejemplo, algunos estudios han reportado dos especies de *Oscheius* como *Oscheius caroliniesis* y *Oscheius chongmingensis* (Rhabditida: Rhabditidae) como entomopatógenas por su asociación con bacterias del género *Serratia* (Lisnawita et al 2010; Zhang et al., 2008). La discusión sobre la clasificación de *O. caroliniesis* y *O. chongmingensis* está muy dividida ya que en algunos trabajos se afirma que son entomopatógenos bajo la premisa de que son efectivos para matar insectos plaga. Torres-Barragan et al. (2011), mencionan que *O. caroliniesis* es efectivo contra *G. mellonella* (Lepidoptera: Galleridae), *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae), *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae), *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) y *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae) ya que pudo penetrar, colonizar y matar a estos hospederos. Los autores mencionan que *O. caroliniesis* se asoció con cuatro especies bacterianas, una de ellas, *Serratia marcescens* que parece estar en la cutícula de los JIs proporcionando a los nemátodos un potencial entomopatógeno.

Sin embargo, aún no queda claro la estabilidad de la relación entre *O. chongmingensis* y su simbionte bacteriano, ya que no está definido si es obligada o transitoria o si los juveniles en fase 3 recuperan la bacteria dentro del hospedero para poder salir como juveniles infectivos.

Contrario al trabajo de Torres-Barragan (2011), en otros trabajos se considera que *O. caroliniesis* y *O. chongmingensis* no cumplen los criterios de un estilo de vida entomopatógeno, ya que si una especie de nemátodo es realmente entomopatógena debería mostrar una efectividad y comportamiento similar a la de las especies de NEPs ya establecidas. Zhang et al. (2019) evaluaron la virulencia y comportamiento de *O. chongmingensis* al exponerlos con cadáveres congelados, cadáveres infectados por *S. carpocapsae* y larvas de *G. mellonella* no infectadas. Dentro de los resultados se reportó baja virulencia (25%) en larvas de *G. mellonella*. En los ensayos de quimiotaxis, las etapas infecciosas del nemátodo prefirieron los olores asociados con los cadáveres infectados por *S. carpocapsae* que por larvas vivas. Además, *O. chongmingensis* pudo desarrollarse en cultivos bacterianos de *X.*

nematophila in vitro. Por el contrario, *S. carpocapsae* no pudo desarrollarse en *Serratia nematodiphila* (simbionte de *O. chongmingensis*). Dadas estas características, los autores sugieren reclasificar a *O. chongmingensis* ya que se comporta más como un carroñero que como un entomopatógeno.

Por otro lado, la eficacia parasitaria de *Steinernema* y *Heterorhabditis* se caracteriza por sus estrategias para invadir el interior del hospedero, las cuales se clasifican en dos: cruceros y emboscadores. Los cruceros como *Steinernema glaseri* y *Heterorhabditis bacteriophora* buscan de forma activa al hospedero en el perfil del suelo (Lewis et al., 1992). Por el contrario, los emboscadores como *S. carpocapsae* y *Steinernema scapterisci* manifiestan poca movilidad y permanecen cerca de la superficie del suelo para poder pararse sobre sus colas y saltar de forma direccionada como respuesta a las señales emitidas por el huésped (Campbell y Gaugler, 1993). Aunque también hay especies de nemátodos como *Steinernema riobrave* y *Steinernema feltiae* que pueden presentar ambos comportamientos (Lewis, 2002). La estrategia de crucero es más efectiva contra insectos sedentarios que se encuentran por debajo de la superficie del suelo y los emboscadores para insectos móviles sobre la superficie del suelo. Por ejemplo, *S. carpocapsae* sería una mala elección para combatir larvas de escarabajo, ya que estas larvas son sedentarias y permanecen en el perfil del suelo. Sin embargo, *S. glaseri* y *H. bacteriophora* responden fuertemente a estas larvas móviles pudiendo parasitarlas (Georgis y Gaugler, 1991). Si bien estos nemátodos ofrecen muchas ventajas que los vuelven efectivos al controlar plagas, se sabe que factores abióticos como tipo de suelo, humedad y temperatura pueden causar efectos negativos en su capacidad infectiva. Por ejemplo, *S. feltiae* puede infectar en un rango de temperatura de 2 a 30°C y los miembros del género *Heterorhabditis* son efectivos de 7 a 35°C (Lacey et al., 2006). Koppenhöfer et al. (2006) determinaron si la emergencia de NEPs de los cadáveres de los insectos está influenciada por la humedad, reportando que *S. carpocapsae* emergió de cadáveres que se encontraban en suelo franco arenoso con humedad de 5 Mpa (muy seco) mientras que *S. glaseri* requería humedad mínima de 0.3 Mpa para emerger. Los autores mencionan que posiblemente se deba a que *S. carpocapsae* está adaptado a sentarse y esperar en la superficie de

suelo por su tipo de estrategia para parasitar. Por el contrario, *S. glaseri* busca activamente al hospedero en el perfil de suelo, y necesita de mayor humedad. Estos aspectos son importantes de valorar al elegir la cepa de NEP a utilizar, ya que el comportamiento y ecología de los NEPs determinara su eficacia en campo.

Taxonomía de NEPs

Steinernema y *Heterorhabditis* se consideran géneros estrechamente relacionados bajo el orden Rhabditida ya que presentan caracteristicas morfologicas similares. Sin embargo, se han desarrollado claves de características sistemáticas detalladas que actualmente se utilizan para la identificación de especies de NEPs (Poinar, 1993).

Familia Steinernematidae (Chitwood y Chitwood, 1937):

La familia Steinernematidae actualmente comprende dos géneros, *Steinernema* Travassos (1927), con más de 10 especies y *Neosteinernema* Nguyen y Smart (1994), con una sola especie *Neosteinernema longicurvicauda*. Los rasgos de diagnóstico incluyen: adultos con cabeza truncada a ligeramente redonda. Seis labios fusionados, con puntas distintas y con una papila labial cada uno. Cuatro papilas cefálicas presentes y anfidios pequeños. Estoma reducido, corto y ancho, con paredes esclerotizadas discretas. Esófago rabditoide que se encuentra separado del intestino.

El anillo nervioso que generalmente rodea el istmo o la parte anterior del bulbo basal. Las hembras tienen ovarios opuestos emparejados. Vagina corta y musculosa. Vulva ubicada cerca de la mitad del cuerpo, con o sin labios protuberantes. Espículas emparejadas, simétricas. Gubernáculo presente. Papilas genitales presentes que van de 10 a 14 pares, de los cuales de siete a 10 pares son pre-cloacales. Cola redondeada, digitada o mucronada, sin bursa. Juvenil infeccioso de tercer estadio con estoma colapsado. Cutícula anulada, campo lateral con seis a ocho crestas en la mitad del cuerpo. Esófago e intestino colapsados. Bolsa bacteriana especializada ubicada al comienzo del intestino y de forma variable. Poro

excretor distinto, anterior al anillo nervioso. Cola conoide o filiforme. Fásmidios presentes, prominentes o discretos (Figura 4).

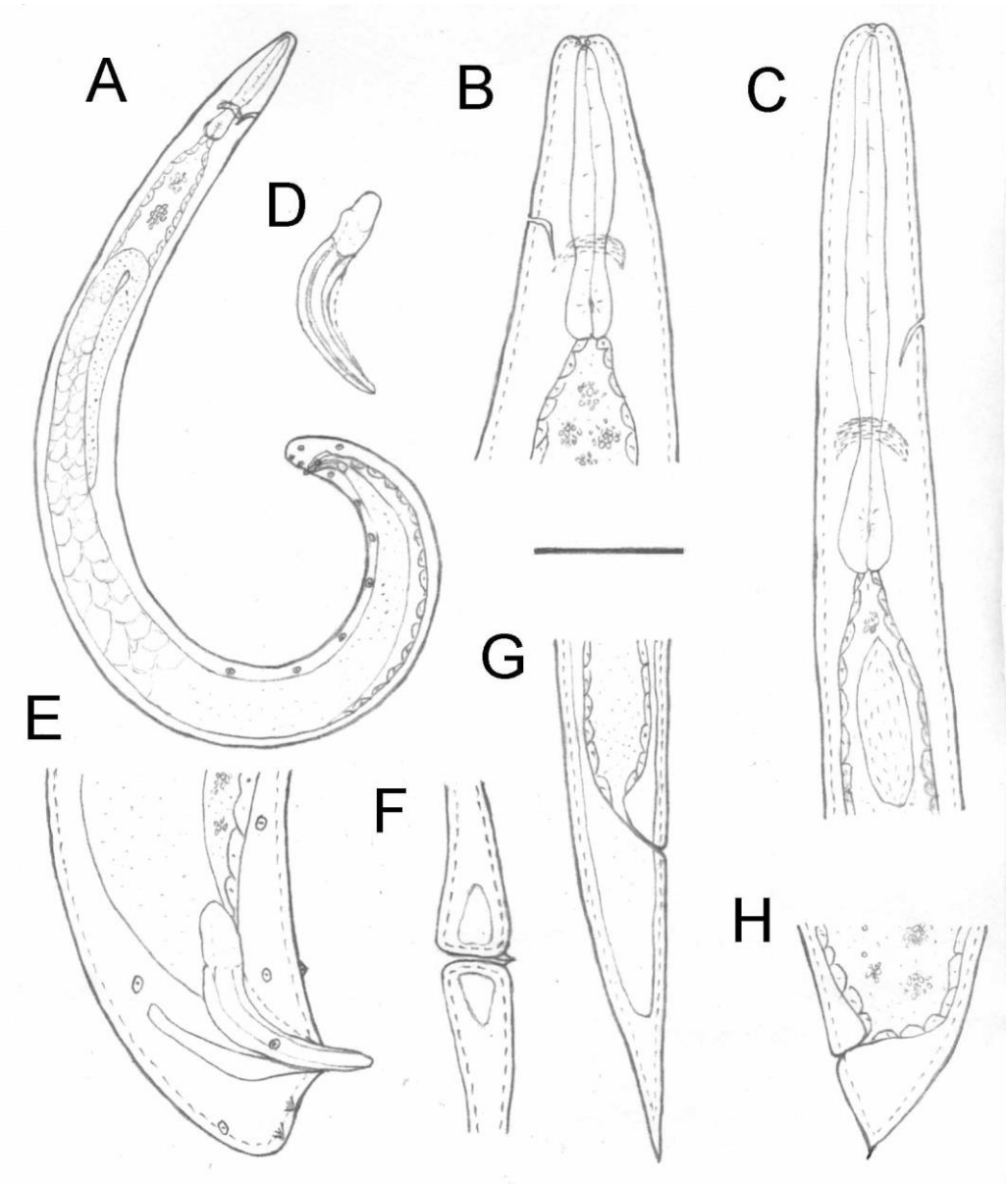

Figura 4. Características morfológicas del género *Steinernema* en vista lateral. A) todo el cuerpo, B) la región anterior, C) la región anterior, D) Espícula, E) cola de macho de primera generación; F) hembras con vulva a mitad del cuerpo, a veces con una protuberancia con o sin epiptygma, G) cola de la hembra de primera generación y H) la cola del juvenil infectivo. Barra de escala (en µm): A = 320; B = 100; C = 32; D = 32; E = 65; F = 78; G = 28 y H = 90 (Tomado de Qiu et al., 2011).

Familia Heterorhabditidae Poinar (1976).

Heterorhabditidae consta de un género, *Heterorhabditis* Poinar (1976), con *Heterorhabditis bacteriophora* como tipo y más de 20 especies descritas. Los rasgos de diagnóstico clave incluyen: adultos con seis labios puntiagudos que sobresalen y rodean la abertura oral. Cada labio con una papila labial terminal. Estoma corto y ancho, esófago de tipo rabditoide. Istmo corto, bulbo basal piriforme con vulva reducida. Poro excretor generalmente ubicado a nivel del bulbo basal. Hermafrodita (primera generación) con ovotestis. Vulva ubicada cerca de la mitad del cuerpo. Hinchazón post-anal presente o ausente. Hembra anfidélfica (en referencia a las hembras de la segunda generación), vulva ubicada cerca de la mitad del cuerpo, con o sin labios protuberantes. Cola conoide; hinchazón post-anal presente o ausente. Bursa pelodera o leptodera. Macho (segunda generación) monórquico. Espículas pares, simétricas, rectas o arqueadas, con puntas puntiagudas. Gubernáculo delgado, alrededor de la mitad de la longitud de las espículas. Bursa abierta, pelodera, asistida por un complemento de nueve pares de radios bursales (papilas). IJ de tercer estadio envainado en cutícula de juvenil de segundo estadio. Cutícula de J2 con crestas longitudinales en la mayor parte de la longitud del cuerpo y un patrón teselar en la región más anterior. Campo lateral con dos crestas. Diente dorsal cuticular prominente presente. Poro excretor situado posterior al bulbo basal. Cola corta, conoide, estrechándose hasta una pequeña punta en forma de púas (Figura 5).

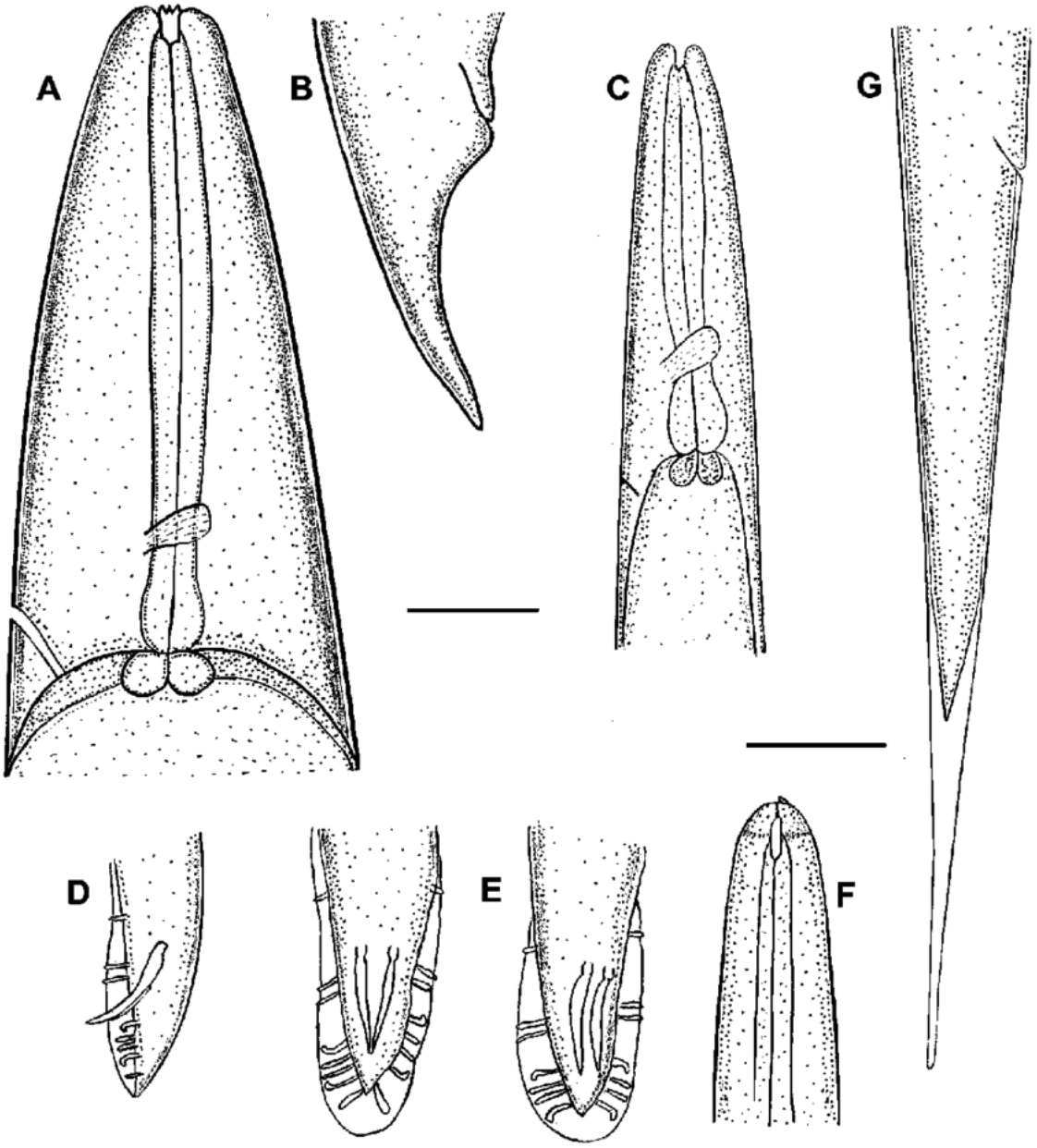

Figura 5. Características morfológicas del género *Heterorhabditis*. *Heterorabditis floridensis* n. sp. A, B: Regiones anterior y posterior de un hermafrodita; C: Región anterior de un macho; D: Región posterior de un macho mostrando espícula en vista lateral; E: Región posterior de un macho en vista ventral mostrando espículas, ala caudal y papilas; F: Región anterior de un juvenil infectivo; G: Cola de un juvenil infectivo envainado que muestra el extremo de la cutícula de la segunda etapa y el juvenil de la tercera etapa. Barra de escala: A-E = 50 µm, F, G = 15 (Nguyen et al., 2006).

Diferencias entre los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis*

Los ejemplares adultos (1ª y 2ª generación) y juveniles infectivos de *Steinernema* y *Heterorhabditis* muestran algunas características morfológicas distintivas que son importantes desde el punto de vista taxonómico (Grewal y Nardo, 2001). Estas características son la longitud de la cola y la posición del poro excretor con respecto al anillo nervioso, ya que debe situarse anterior al anillo nervioso en *Steinernema* y posterior al anillo nervioso en *Heterorhabditis* y la forma de la vulva en hembras. En ejemplares machos, la identificacion se basa en el tamaño y forma del gubernáculo y espículas, presencia o ausencia de mucrón caudal, disposición de las papilas copulatorias y morfología del espermatozoide (Spiridonov et al., 1999). En el caso de los JIs, el campo lateral con apariencia de mazorca y la proyeccion cuticular que asemeja un diente en *Heterorhabditis*, asi como la forma y longitud de la cola y el contorno de la cabeza son algunas de las características de importancia taxonómica (Grewal y Nardo, 2001).

Hoy en día, la caracterización morfológica no da resultados confiables ya que ha habido un aumento en el número de especies que hace obligatorio el complementar la taxonomía clasica con la caracterización molecular para la identificación de especies (Subbotin y Moens, 2006). La morfología depende completamente de las características externas del espécimen. Sin embargo, algunos genes tienen la tendencia a no expresarse en forma de fenotipo aunque poseen algunas regiones conservadas que son muy importantes desde el punto de vista taxonómico. Esto crea una demanda de identificación y validación molecular de cada especie en particular. Los avances en las técnicas moleculares ayudan en la identificación precisa y la ubicación de la especie en su posición apropiada en la clasificación. Se están utilizando varias técnicas moleculares para una identificación más precisa de NEPs, como la reacción en cadena de la polimerasa, seguido de la amplificación y secuenciación de los productos amplificados de las áreas conservadas (Didiza et al., 2021). Se utilizan ADNr 28S y 18S para comparar los taxones distantes que divergieron hace mucho tiempo. Además de esto, IGS, ITS1, ITS2 y ETS se están utilizando para comparar la filogenia de especies estrechamente relacionadas en

comparación con los genes de ADNr 28S y 18S (Subbotin y Moens, 2006). La unidad de repetición, el ADNr 18S y 28S y la subunidad II de la citocromo oxidasa (COII) tambien se utilizan ampliamente para la identificación de nemátodos. Hoy en día, regiones de importancia taxonómica que incluyen el espaciador transcrito interno (ITS) del ADN ribosómico (ADNr) son las más utilizadas para distinguir entre *Steinernema* y *Heterorhabditis* a nivel de especie (Adams et al., 1998).

Bacterias simbiontes de NEPs

Las bacterias consideradas entomopatógenas pertenecen a siete géneros*: Bacillus, Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Serratia*, *Pseudomonas, Xenorhabdus* y *Photorhabdus* (Glare et al., 2017). De éstas, existe un particular interés por estudiar a los géneros *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* por sus metabolitos secundarios descritos como compuestos con actividad citotóxica, antimicrobiana, antiparasitaria e insecticida, que sumado a las estrategias de los nemátodos (*Steinernema* y *Heterorhabditis*) logran parasitar con éxito un hospedero. Por lo que al aislar una nueva cepa de nemátodo también se incrementa la posibilidad de descubrir nuevas toxinas para ser utilizadas como bioinsecticidas. Actualmente, se han identificado 26 especies del género *Xenorhabdus* (Tabla 1) (Thomas y Poinar, 1979) y 19 de *Photorhabdus* (Tabla 2) (Boemare et al., 1993). Por lo general, cada especie de *Steinernema* establece simbiosis con una sola especie de *Xenorhabdus*; a su vez, muchas especies de *Xenorhabdus* pueden asociarse con varias especies de nemátodos.

Tabla 1. Lista de especies descritas del género *Xenorhabdus* y de su nemátodo simbionte (Tomado de Sajnaga y Kazimierczak, 2020).

Especies de *Xenorhabdus*	Especies de *Steinernema*	Referencias
X. beddingii	Especie no descrita	Akhurst and Boemare 1988
X. bovienii	*S. feltiae, S. kraussei, S. affinae, S. intermedium, S. weiseri, S. silvaticum, S. sichuanense, S. nguyeni, S. poinari, S. tbilisiensis, S. jollieti, S. puntauvense, S. oregeonense, S. littorale*	Akhurst and Boemare 1988
X. budapestensis	*S. bicornutum, S. ceratophorum*	Lengyel et al. 2005
X. cabanillasii	*S. riobrave*	Tailliez et al. 2006
X. doucetiae	*S. diaprepesi*	Tailliez et al. 2006
X. ehlersii	*S. longicaudum (S. serratum)*	Lengyel et al. 2005

X. eapokensis	*S. eapokensis*	Kämpfer et al. 2017
X. griffiniae	*S. hermaphroditum*	Dreyer et al. 2017
X. hominickii	*S. karii, S. monticolum*	Tailliez et al. 2006
X. indica	*S. thermophilum, S. abbasi*	Somvanshi et al. 2006
X. innexi	*S. scapterisci*	Lengyel et al. 2005
X. ishibashii	*S. aciari*	Kuwata et al. 2013
X. japónica	*S. kushidai*	Nishimura et al. 1994
X. khoisanae	*S. khoisanae, S. jeffreyense, S. saccharii*	Ferreira et al. 2013
X. koppenhoeferi	*S. scarabaei*	Tailliez et al. 2006
X. kozodoii	*S. arenarium*	Tailliez et al. 2006
X. magdalenensis	*S. australe*	Tailliez et al. 2012
X. mauleonii	Especie no descrita	Tailliez et al. 2006
X. miraniensis	Especie no descrita	Tailliez et al. 2006
X. nematophila	*S. carpocapsae*	Poinar and Thomas 1965
X. poinarii	*S. glaseri, S. cubanum*	Akhurst 1983
X. romanii	*S. puertoricense*	Tailliez et al. 2006
X. stockiae	*S. siamkayai*	Tailliez et al. 2006
X. szentirmaii	*S. rarum*	Lengyel et al. 2005
X. thuongxuanensis	*S. sangi*	Kämpfer et al. 2017
X. vietnamensis	*S. sangi*	Tailliez et al. 2010

Esto difiere para *Heterorhabditis*, ya que muchas especies tanto de bacterias como de nemátodos pueden participar en asociaciones simbióticas (Koppenhöfer, 2007). En el caso de *Xenorhabdus,* la especie más diversa entre las bacterias (a nivel de subespecie) de NEPs es *Xenorhabdus bovienii* (Murfin et al., 2015).

Tabla 2. Lista de especies descritas del género *Photorhabdus* y de su nemátodo simbionte (Tomado de Sajnaga y Kazimierczak, 2020).

Especies de *Photorhabdus*	**Especies de *Heterorhabditis***	**Referencias**
P. akhurstii	*H. indica*	Fischer-Le Saux et al. 1999, Machado et al. 2019.
P. asymbiotica	*Especie no descrita*	Fischer-Le Saux et al. 1999, Akhurst et al. 2004.
P. australis	*H. gerrardi, H. indica,*	Akhurst et al. 2004, Machado et al. 2019.
P. bodei	*H. beicherriana*	Machado et al. 2019.
P. caribbeanensis	*H. bacteriophora*	Tailliez et al. 2010, Machado et al. 2019.
P. cinerea	*H. downesi, H. megidis, H. bacteriophora*	Tóth and Lakatos 2008, Machado et al. 2019.
P. hainanensis	*Especie no descrita*	Tailliez et al. 2010, Machado et al. 2019.
P. heterorhabditis	*H. zealandica*	Ferreira et al. 2014
P. kayaii	*H. bacteriophora*	Ferreira et al. 2014
P. khanii subsp. guanajuatensis	*H. atacamensis*	Tailliez et al. 2010, Machado et al. 2019.
P. kleinii	*H. georgiana, H. bacteriophora*	An y Grewal 2011, Machado et al. 2019.
P. laumondii subsp. *clarkei,* subsp. *laumondii*	*H. bacteriophora*	Fischer-Le Saux et al. 1999, Machado et al. 2019.

P. luminescens subsp. *sonorensis*, subsp. *mexicana*	*H. bacteriophora, H. indica, H. sonorensis, H. mexicana*	Orozco et al. 2013.
P. namnaonensis	*H. baujardi*	Glaser et al. 2017, Machado et al. 2019.
P. noenieputensis	*H. indica, Heterorhabditis sp.*	Ferreira et al 2013, Machado 2019.
P. stackebrandtii	*H. bacteriophora, H. georgiana*	An y Grewal 2010, Machado et al. 2019.
P. tasmanensis	*H. zealandica, H. marelatus*	Tailliez et al. 2010, Machado et al. 2019.
P. temperata	*H. megidis, H. downesi y H. zealandica*	Fischer-Le Saux et al. 1999, Machado et al. 2019.
P. thracensis	*H. bacteriophora*	Hazir et al. 2004, Tailliez et al. 2010,

En cuanto a la identificación de *Xenorhabdus* y *Photorhabdus*, se realizan análisis de filogenia molecular complementado con un número cada vez mayor de genes y secuencias genómicas disponibles para alcanzar la identificación de estas bacterias a nivel de especie o subespecie. Machado et al. (2019) realizaron un análisis filogenético con el genoma completo de dos cepas bacterianas (MEX20-17T y MEX47-227) aisladas del intestino de *H. atacamensis* y *H. mexicana*. La caracterización fisiológica indicó que ambas cepas bacterianas difirieron de todas las especies de *Photorhabdus* descritas, por lo que propone dos nuevas subespecies, *Photorhabdus khanii* subsp. *guanajuatensis* y *Photorhabdus luminescens* subsp. *mexicana*.

Por otro lado, las interacciones entre NEPs y sus simbiontes bacterianos se han considerado por mucho tiempo asociaciones monoxénicas y las únicas responsables de la muerte de los insectos (Ogier et al., 2020). Esto es, posiblemente por las limitaciones de la metodología para identificar bacterias por medios de cultivo dependientes. Sin embargo, se han observado bacterias no identificadas en el espacio intercelular entre las cutículas de la segunda y tercera etapa de los estadios juveniles de nemátodos. Por ejemplo, Enright y Griffin (2004) encontraron una especie bacteriana formadora de endosporas, *Paenibacillus nematophilus*, asociada naturalmente con una cepa de *Heterorhabditis megidis*. Para evaluar la especificidad de esta asociación, se evaluó la capacidad de adherencia de los esporangios de tres especies de bacterias (*Paenibacillus nematophilus* NEM1a, *Paenibacillus* sp. NEM2 y *Paenibacillus* sp. NEM3) a los JIs de distintas especies

de nemátodo. Los autores observaron que los esporangios se adhieren únicamente a los JIs de *Heterorhabditis* y son transportados hasta entrar al hospedero donde se reproducen a pesar de los antibióticos liberados por *Photorhabdus*. Poco antes de que los JIs emergen del hospedero, los esporangios se reincorporan a la cutícula de los JIs. Del mismo modo, se encontró que los esporangios se adhieren a los JIs de especies de *Strongylida* (especies filogenéticamente cercanas a *Heterorhabditis*). Concluyeron que posiblemente se haya producido un grado de adaptación entre la asociación de *Paenibacillus*, *Heterorhabditis* y *Photorhabdus*. Actualmente se realizan estudios de metagenómica para el estudio de comunidades bacterianas que han permitido tener un panorama más claro sobre la interacción nemátodo-bacteria-hospedero. Ogier et al. (2020) reportaron el perfil microbiano de juveniles infectivos de cuatro especies de *Steinernema* mediante análisis de metagenómica utilizando dos marcadores moleculares (v3v4 y rpoB). Los autores identificaron más de 30 OTUs que fueron comparados con grupos taxonómicos aislados de cultivos dependientes (medios de cultivo con estriados de hemolinfa de *G. mellonella* previamente infectada con juveniles infectivos). Estos grupos taxonómicos aislados coincidieron un 70% con los OTUs identificados por metagenómica, donde las mayores abundancias pertenecen a los géneros: *Stenotrophomonas*, *Serratia*, *Achromobacter, Xenorhabdus*, *Pseudomonas*, *Delftia* y *Alcaligenes*. El papel que juegan estas bacterias tanto en los JIs como en el hospedero infectado está por definirse. Lo que está claro, es que el interés por estudiar estas asociaciones con herramientas moleculares de siguiente generación va en aumento.

Diversidad de NEPs en México y su eficacia contra insectos plaga

Desde 1998 se han realizado colectas de NEPs en diferentes estados de México para conocer su diversidad y eficacia contra insectos plagas (Molina-Ochoa et al., 2003; Zepeda-Jazo et al., 2014). Los primeros estudios comenzaron con la evaluación de una cepa no nativa *Steinernema carpocapsae* Weiser, para controlar *Zadiprion falsus* Smith (Hymenoptera: Diprionidae) y *Dendroctonus adjunctus*

Blandford (Coleoptera: Curculionidae) en pinos (Alatorre-Rosas, 1971). Posteriormente, en Chihuahua se identificó una cepa nativa de *Steinernema carpocapsae* aislada de *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) (Poinar, 1979). Dado que los NEPs son organismos de suelo extremadamente comunes, sus cepas han sido aisladas en todas las regiones donde alguien ha realizado un esfuerzo de búsqueda. En México, las especies aisladas más reportadas son *H. bacteriophora*, *H. indica* y *H. mexicana* (también *Steinernema,* pero la mayoría se reporta a nivel de género) (Figura 6). En Oaxaca es donde se ha encontrado mayor diversidad con cuatro especies identificadas: *S. feltiae*, *H. mexicana*, *S. carpocapsae* y *H. indica*.

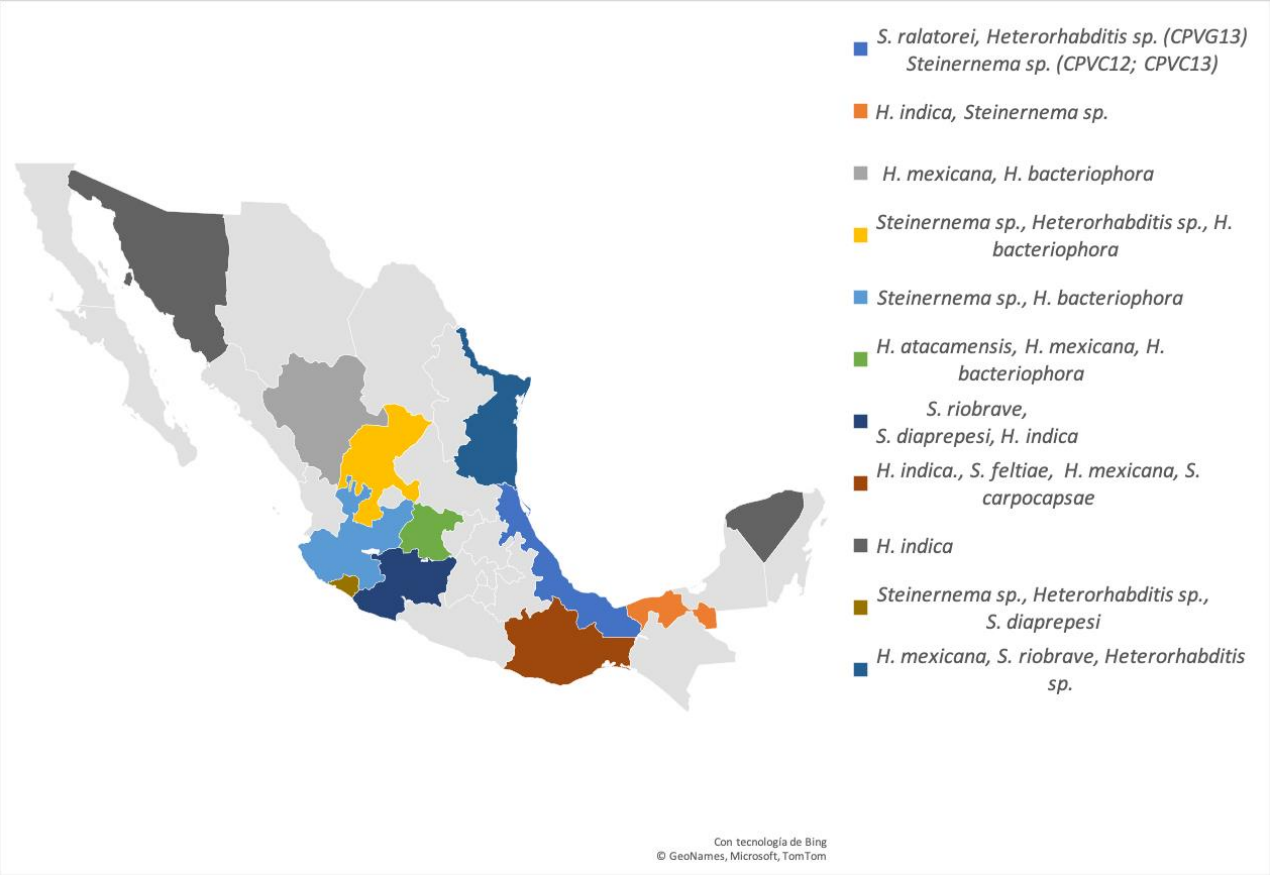

Figura 6. Estados de la república mexicana donde se han aislado NEPs (Bruno et al., 2020).

Los NEPs han sido aislados de cultivos de caña de azúcar, guayaba, palmas de plátano, lima mexicana, maíz, sorgo, así como de césped y valles. Esto con el fin de encontrar enemigos naturales más eficientes para ser probados contra plagas.

Los NEPs de los generos *Steinernema* y *Heterorhabditis* se han explotado con éxito en el control de insectos plaga, principalmente en plagas de importancia económica como son; *Diatrea saccharalis*, *Aeneolania albofasciata* (plagas de caña de azúcar), *Phyllophaga polyphylla* (plaga de maíz), *Scyphophorus interstitialis* (picudo negro del agave) entre otras (Andaló et al., 2012) (Tabla 3). Una de las principales ventajas de estos nemátodos es su capacidad y estrategias de búsqueda que les permite llegar a puntos donde es difícil combatir con insecticidas. Un ejemplo son las ninfas de salivazo *Aeneolamia albofasciata* que recién eclosionadas inician la producción de saliva que las cubre por completo para darles protección contra sus enemigos naturales.

También se han evaluado cepas de NEPs no nativas de México contra plagas de interés público como la mosca de la fruta *Anastrepha obliqua,* que causa perdidas considerables (10 al 25%) en la producción de mango (Aluja et al., 1994). Toledo et al. (2005a), evaluaron el efecto de la temperatura, la textura del suelo y la profundidad del hospedero sobre la capacidad infectiva de *Heterorhabditis bacteriophora* (cepa aislada en Costa Rica) en larvas de *A. obliqua* de tercer estadio inicial y tardío. Los resultados de este estudio mostraron mayor mortalidad (85%) en larvas de tercer estadio inicial en suelo con textura areno-arcillosa con 15% de humedad y con una temperatura de 24°C a una concentración letal media (CL_{50}) de 25 ± 4.2 IJ/cm^2. Demostrando el potencial de la cepa no nativa de *H. bacteriophora* para infectar y matar larvas de la mosca de la fruta en condiciones de laboratorio.

A pesar de los casos de éxito de NEPs reportados contra distintas plagas, la mayoría han sido en condiciones de laboratorio. Pocos son los trabajos donde se evalúan factores químicos o físicos en relación con la capacidad infectiva de los nemátodos en laboratorio y que además se prueben en campo. Toledo et al. (2005b), probaron la capacidad infectiva de *H. bacteriophora* en larvas de la mosca mexicana de la fruta (*Anastrepha ludens*) en condiciones de campo y laboratorio.

En condiciones de laboratorio notaron que la infección de *A. ludens* se vio afectada por baja (6%) y alta (12-24%) humedad de suelo, obteniendo la mayor prevalencia

de infección (70%) con 9% de humedad a una concentración de 125 JI/cm^2. En campo, se probaron dos concentraciones 115 nemátodos/cm^2 y 345 nemátodos/cm^2 en parcelas experimentales en un huerto comercial de mango del estado de Chiapas, México. Dentro de los resultados se registró una mortalidad de 46.7 y 76.1% respectivamente en *A. ludens* a los ocho días de infección. Por el contrario, en muchos casos no se evalúan las interacciones con factores ambientales, esto significa que las especies de NEPs con mayor eficacia en laboratorio pueden no ser necesariamente las más eficaces en campo. Otro de los casos donde la aplicación de NEPs ha sido exitosa en campo, es el realizado por Grifaldo et al. (2019) que aplicaron *Heterorhabditis indica* y *Steinernema* sp. en parcelas de caña de azúcar en Veracruz, México. Los autores realizaron dos ensayos, en el primero probaron ambas cepas de nemátodos con el dispersante Break-Thru® y lo aplicaron para controlar ninfas de salivazo pertenecientes a dos géneros *Aeneolamia* y *Prosapia* (Hemiptera: Cercopidae). En el segundo ensayo sólo aplicaron *Steinernema* sp. (más dispersante) en parcelas de 1 m^2. La suspensión de NEPs aplicada en ambos ensayos fue de 66,000 JIs/m^2. Los resultados demostraron que con *H. indica* se obtuvo 73% de mortalidad de las ninfas y con *Steinernema* sp. se alcanzó un 62%. La aplicación de *Steinernema* sp. más dispersante mantuvo baja la población de ninfas durante los cuatro días de la evaluación en comparación con el tratamiento testigo (agua + dispersante). El aditivo utilizado (Break-Thru®), pudiera tener efectos negativos sobre la capacidad infectiva de los nemátodos. Sin embargo, en este estudio no se evaluó dicho efecto. Por otro lado, los autores mencionan que es importante estandarizar la producción masiva de nemátodos para poder hacer uso comercial de estas cepas.

Tabla 3. NEPs utilizados contra plagas agrícolas en bioensayos bajo condiciones de laboratorio.

NEMATODO	SITIO DEL AISLADO	PLAGA	CONCENTRACION DE NEMATODOS USADA	MORTALIDAD ALCANZADA	REFERENCIA
Steinernema ralatorei	Veracruz	Larvas de *Diatraea saccharalis*	200 IJ/individuo	93% a las 12 horas de exposición bajo condiciones de laboratorio.	Grifaldo-Alcántara et al. (2017)
Heterorhabditis indica	Tabasco	Barrenador de ramas de aguacate (*C. aguacatae*)	2,500 IJ/mL^{-1}	100% a las 44 horas de infección.	Sánchez-Saavedra et al. (2012)
H. bacteriophora (cepa nativa) *S. feltiae, H. bacteriophora S. carpocapsae*	Oaxaca	Larvas y adultos del picudo negro del agave *Scyphophorus interstitialis*	4,500 y 9,000 IJ/insecto	90.31% (*H. bacteriophora* cepa nativa), 84.23% (*S. feltiae),* 78.23% (*H. bacteriophora),* 76.88% (*S. carpocapsae).*	Bolaños et al. (2006).
Heterorhabditis indica y *Steinernema* sp.		ninfas de salivazo pertenecientes a dos géneros *Aeneolamia* y *Prosapia* (Hemiptera: Cercopidae).	*	73% (H. indica) y 62% (Steinernema sp), en condiciones de campo.	Grifaldo-Alcántara et al. (2019, 2020)
Heterorhabditis indica, Heterorhabditis sp. y Steinernema sp.	Tabasco Michoacán	adultos y larvas de *Musca domestica*	1,600 IJ/ml^{-1}.	Solo H. indica alcanzo 79% en hembras, 35% en machos y 53% en larvas de M. domestica, bajo condiciones de laboratorio.	Arriaga y Cortez-Madrigal (2018)

EFICACIA DE NEPs CONTRA LARVAS DE MOSQUITO

Se ha demostrado que los NEPs son eficaces para combatir plagas terrestres, pero también son efectivos para combatir plagas con ciclo de vida acuático, tal es el caso de las larvas de mosquito de diversos géneros (Tabla 4) (Pandii et al., 2008; Cardoso et al., 2015; Silva et al., 2019; Chaudhary et al., 2017; Toksoz y Saruhan, 2018; Ansari y Hussain, 2020). Por ejemplo, Edmonds et al., (2017) demostró la susceptibilidad de *Chironomus plumosus* al ser parasitada hasta en un 80% por *S. feltiae*, *S. carpocapsae*, *S. kraussei* y *H. bacteriophora* en el transcurso de 4 días. El hecho de que los NEPs y su simbionte bacteriano sean efectivos en fase acuática no es nuevo, ya que Welch y Bronskill (1962), lo demostraron por primera vez cuando observaron que *S. carpocapsae* penetro la cavidad del cuerpo de larvas de *Ae. Aegypti* lo que les causo septicemia al llegar al hemocele. A pesar de que muchos autores refieren esta capacidad infectiva en mosquitos, existe la controversia de la supervivencia de NEPs en el agua.

Sunanda et al., (2012) reportaron que *S. abbasi* y *H. indica* tienen una efectividad del 85 y 88% a 30°C después de 15 días de exposición. Además, *H. indica* puede conservarse en agua destilada a 8 y 30°C durante 42 días, lo que comprueba su efectividad y longevidad en agua. Del mismo modo, Amit et al., (2017) reporto una tasa de supervivencia del 77% a una temperatura de 20°C en ejemplares de *H. indica* al termino de 90 días de incubación. Cuando los nemátodos son depositados en contenedores de agua con larvas de moscos, estos se hunden hasta llegar al fondo donde se encuentran con las larvas de mosco que bucean la comida para atrapar pequeños organismos con su cepillo bucal. En ese momento los NEPs son ingeridos por las larvas de mosquito. Treviño et al., (2021) enfatiza esta estrategia ya que observo infectivos juveniles en la cápsula de la cabeza de *Ae. Aegypti* posterior a la exposición con NEPs.

Tabla 4. NEPs utilizados contra larvas de mosco en bioensayos bajo condiciones de laboratorio.

NEMATODO	SITIO DEL AISLADO	PLAGA	CONCENTRACION DE NEMATODO USADA	MORTALIDAD ALCANZADA	REFERENCIA
Heterorhabditis indica LPP35	Brasil	Larva de *Aedes aegypti*	160 IJ/larva mosco	85 %	Cardoso et al., (2015).
Heterorhabditis indica LPP35	Brasil	Larva de *Aedes aegypti*	100 IJ/larva mosco	75%	Silva et al (2019).
Steinernema carpocapsae	Bangkok	Larva de *Culex gelidus*	4,000 IJ/larva mosco	63 % en 96 horas de infección	Pandii et al., (2008).
Steinernema kraussie y *Heterorhabditis bacteriophora*	Pakistán	Larva *Aedes aegypti*	100 IJ/larva mosco	100 % en 48 y 96 horas de infección	Chaudhary et al., (2017).
S. carpocapsae y H. bacteriophora	Turquía	*Culex pipiens*	1500 IJ/ml^{-1}	86 - 100% a las 96 y 72 horas de infección	Toksoz y Saruhan (2018).
H. bacteriophora y S. carpocapsae	Londres	Larvas de Ae. aegypti	100 IJ/larva	90-100% a las 72 horas de infección.	Ansari y Hussain (2020).

2.6 Patogénesis de NEPs y la Interacción con su hospedero.

La mayoría de las especies de NEPs son capaces de infectar y causar enfermedades a una amplia gama de insectos plaga que pertenecen a distintos órdenes (Grewal et al., 2005; Shapiro - Ilan et al., 2016). Por ejemplo, *S. carpocapsae* tiene un rango de hospederos de >200 insectos de 10 órdenes que han sido probados en laboratorio (Poinar, 1979). Sin embargo, hay otras especies de nemátodos que tienen hospederos específicos como *S. scarabaei*, que solo parasita insectos de la familia Melolonthidae (Koppenhöfer y Fuzy, 2003), y *S. scapterisci*, que es específico de Orthoptera (Nguyen y Smart, 1991).

La patogenicidad del complejo nemátodo-bacteria está regulada por la interacción de tres componentes biológicos: 1) la reacción de defensa del hospedero, 2) las propiedades patogénicas del nemátodo y 3) la patogenicidad del simbionte bacteriano (Boemare et al., 1997). Cuando los juveniles infectivos de vida libre encuentran un hospedero, penetran por orificios naturales como boca, ano o espiráculos. Sin embargo, el primer obstáculo que deben pasar estos nemátodos son las estrategias de comportamiento que utilizan los insectos para evitar la entrada de patógenos. Algunas de estas estrategias son minimizar su evacuación de CO_2, obstruir su ano con materia fecal o generan capullos impenetrables antes de la pupa que sirven como barreras físicas (Gaugler et al., 1994). Al llegar al hemocele, la segunda barrera de protección con la que se encuentra el nemátodo y la bacteria es el sistema inmune del insecto que combina respuestas celulares y humorales, donde el primer paso es la fagocitosis ocasionada por los hemocitos circulantes. Si el organismo invasor es grande (como los nemátodos), los hemocitos tienen una respuesta de encapsulación, activando una cascada de enzimas fenol-oxidasa que cubre al invasor con una capa de melanina (Kusch y Lemaitre, 2000). Wang y Gaugler (1999), reportaron que *S. glaseri* usa una proteína de recubrimiento superficial (SCP3a) que destruye los hemocitos del hospedero y evita la encapsulación en el escarabajo japonés (*Popollia japonica*). Por otro lado, la respuesta inmune del hospedero puede reaccionar de forma diferente dependiendo la especie o población de nemátodos. Por ejemplo, Li et al (2007) reportaron que

Manduca sexta (Lepidoptera: Sphingidae) pudo resistir la infección por *H. bacteriophora* al reconocer a este patógeno como “no propio” y encapsularlo a un 99%. Sin embargo, cuando se infectó el mismo hospedero con *S. glaseri* la encapsulación fue menor ya que el sistema inmune del insecto sólo reconoció un 28% al patógeno.

La lisozima y péptidos antibacterianos los produce la respuesta humoral del insecto y son sintetizados cuando se presenta una infección (Kusch y Lemaitre, 2000). La superación del sistema inmune del hospedero se lleva a cabo de varias maneras: los steinernemátidos pueden matar a sus hospederos sin su simbionte bacteriano, ya que produce proteasas que suprimen la respuesta inmune poco después de la invasión (Lewis y Clarke, 2012). En el caso de los heterorhabdítidos necesitan su simbionte bacteriano para intervenir con la defensa inmune celular al evitar la fagocitosis de los hemocitos (Sambeek y Wiesner, 1999). Después de vencer al sistema inmunológico, las bacterias producen una serie de toxinas para matar al insecto hospedero. Dentro de las más importantes están las toxinas de las proteínas Tc (complejo de toxinas), Mcf y PirAB que han sido detectadas principalmente en *Photorhabdus* y Xpt en *Xenorhabdus* (Tabla 5) (Sergeant et al, 2003; Hinchliffe et al, 2010). Por esta razón es que estas bacterias son altamente virulentas cuando se inyectan directamente en las larvas de insectos. Por ejemplo, Akhurst y Boemare, (1990) reportaron alta patogenicidad de *Xenorhabdus* al inyectar <100 células en larvas de *G. mellonella*.

Tabla 5. Proteínas que codifican toxinas por las bacterias simbiontes, con capacidad insecticida (Hinchliffe et al, 2010; Sergeant et al, 2003).

Toxinas insecticidas:	**Causa:**
TC (Tca, Tcb, Tcc, Tcd)	Deterioro progresivo en las células epiteliales del intestino medio del insecto.
Mcf	Perdida de presión de turgencia que desencadena apoptosis en células epiteliales del intestino medio.
PirAB	Neurotoxicidad

Xpt (XptA1, XptA2, XptB, XptC1)	Apoptosis en células

El primer signo por infección de nemátodos entomopatógenos es el cambio de coloración en los cadáveres de insectos, producido por la bacteria asociada. Los insectos infectados por *Steinernema* adquieren coloración que va del ocre al casi negro y los parasitados por *Heterorhabditis* toman un color rojizo o naranja, donde se observa la emisión de bioluminiscencia (en cuarto oscuro) que es producida por el simbionte bacteriano del género *Photorhabdus*. Esta bioluminiscencia es debida a la enzima luciferasa, que produce una luz azul-verdosa (490 nm) (Poinar *et al.,* 1980). Los genes responsables de la luminiscencia de *Photorhabdus* son los genes *lux* (Frackman et al*,* 1990). Esta bioluminiscencia producida por *Photorhabdus* en los insectos parasitados por heterorhabdítidos parece impedir la actividad saprófita de otros invertebrados (Akhurst y Boemare, 1990).

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

La península de Yucatán tiene una superficie territorial de 39,340 km^2 con un clima tropical-húmedo (AW) con precipitación media anual de 900-1300 mm y temperatura promedio anual de 25-29.6°C; 77-85.3°F donde predominan las selvas secas subhúmedas (INEGI, 2017). La Península de Yucatán está situada en una plataforma de piedra caliza hecha de carbonatos y sedimentos formados en el Holoceno (Herrera-Silveira y Comín, 2000). Está localizada entre los meridianos los 87º30' y los 90º25' de longitud Oeste, y los paralelos 19º40' y 21º37' de latitud Norte, ocupando la porción septentrional de la Península de Yucatán. Limita al oeste y al suroeste, con el estado de Campeche; al norte, con el Golfo de México; y al este y sureste, con el estado de Quintana Roo. El estado de Yucatán esta ubicado geograficamente en el cinturón intertropical mundial por lo cual esta sujeto a las condiciones climáticas propias de esta zona (vientos alisos, nortes, ciclones, etc.). La división política del estado de Yucatán comprende 106 municipios, siendo Mérida la ciudad capital (Figura 7).

Trabajo de campo

Durante los meses de septiembre y octubre de 2018 (temporada de lluvias) se tomaron muestras de suelo de 12 localidades diferentes del estado de Yucatán pertenecientes a los municipios de Peto, Cantamayec, Tikuch, Cansahcab, Dzan, Sucila, Maxcanu, Opichen, Muna, Oxkutzcab Tunkas y Chikindzonot (Figura 7). Se recolectaron muestras de suelo de diferentes cultivos de naranja agria (*Citrus aurantium*) y naranja dulce (*Citrus sinensis*). Los nemátodos fueron recuperados mediante muestras de suelo a escala regional, en sitios con distintos usos de suelo clasificados como ganadería, silvicultura, industrial, agricultura y de conservación.
Se colectaron 4 muestras compuestas (con 3 submuestras) de suelo por localidad; estas se colocaron en recipientes de plástico transparente (1 kilogramo por frasco) para un total de 144 muestras. Los frascos fueron etiquetados, marcados con la fecha, localidad y número de muestra. Cada frasco se perforó en su fondo, antes de tomar la muestra se excavaron 15 cm con una espátula pequeña. Al final de la

colecta, las muestras de suelo fueron colocadas en hieleras de unicel para su transporte. Las muestras de suelo en los frascos fueron llevadas al Laboratorio de Patología Acuática del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Unidad Mérida).

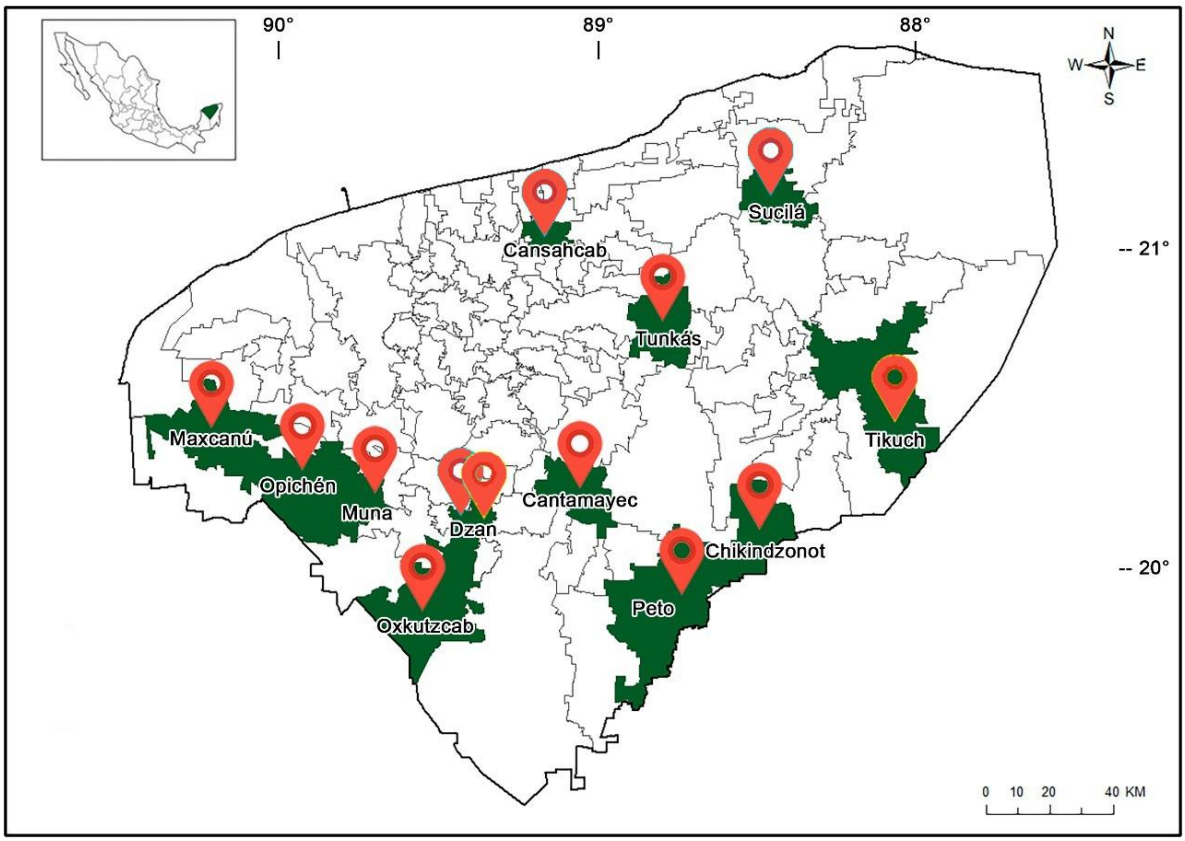

Figura 7. Mapa del estado de Yucatán que muestra los sitios muestreados en busca de nemátodos entomopatógenos.

Trabajo de Laboratorio

El laboratorio de patología acuática cuenta con un área de bioensayos donde se adaptó un criadero de larvas de *Galleria mellonella* (considerada especie plaga de abejas) que fueron empleadas como insecto trampa para el aislamiento de NEPs (Bedding y Akhurst, 1975). Para esto, se colecto un pie de cria de larvas de *G. mellonella* en la localidad de Peto, Yucatán donde se estableció un apiario de *Apis mellifera* con el fin de atraer a su principal enemigo natural, la polilla de la cera (*G.*

mellonella) (Figura 8). Esta polilla en su fase larval destruye las colmenas para alimentarse de la cera, por lo que termina debilitando y matando la colmena. Una vez colectadas las larvas, se comenzó con establecer su ciclo de vida en laboratorio (Figura 9), donde su crecimiento y desarrollo ocurren a una temperatura entre 30-37°C y con una dieta que incluyó miel, azúcar, glicerina, salvado de trigo, harina de trigo, levadura y arroz en polvo.

Figura 8. Apiario de *Apis mellifera* en Peto, Yucatán donde se revisaban las colmenas para la colecta de larvas de *G. mellonella.*

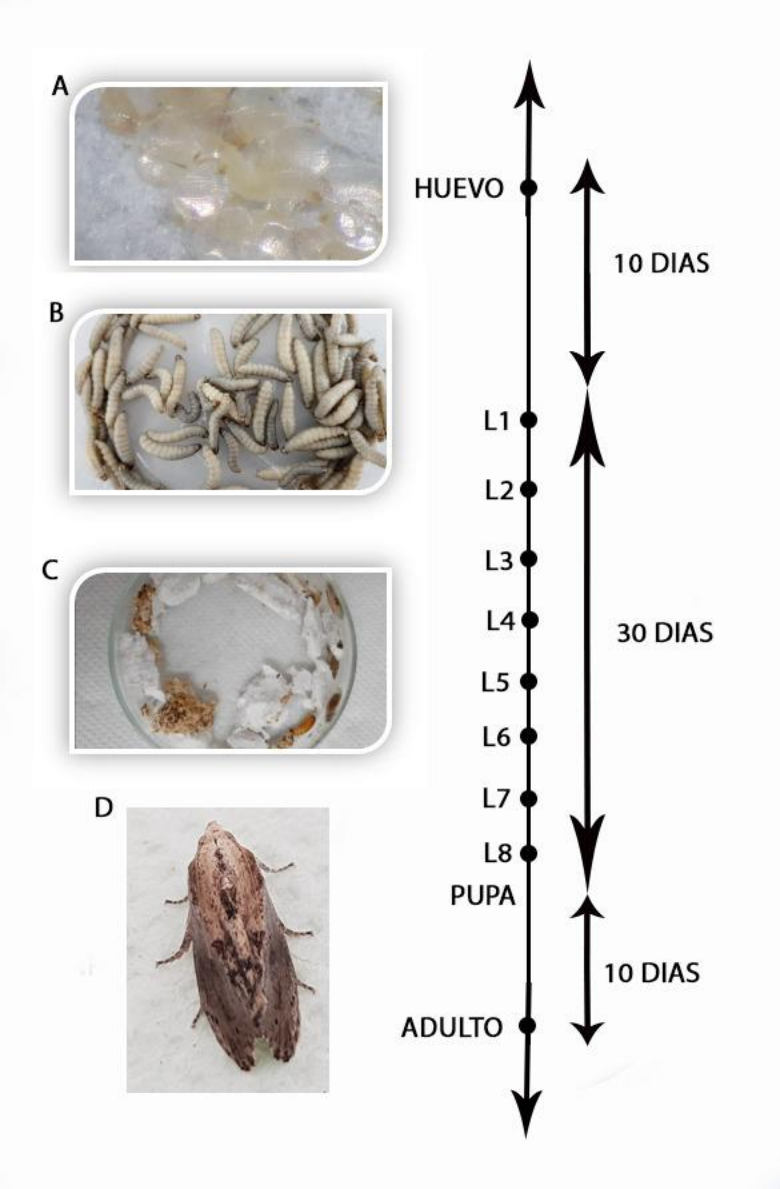

Figura 9. Estados de desarrollo de la polilla de la cera (*G. mellonella*) en el tiempo; A) huevos, B) larvas que se desarrollan hasta en 8 estadios larvales, C) pupas y D) Adulto.

Una vez que las larvas de *G. mellonella* llegaban al cuarto estadio larval, se colocaban en los frascos con tierra previamente colectados. Posteriormente, se utilizaron 4 larvas de *G. mellonella* por frasco, dejándose reposar durante 5 días a temperatura ambiente, hasta la aparición de cambio de color de las larvas, lo que indicaba una posible infección. Las larvas de *G. mellonella* infectadas se colocaban en cámaras húmedas hasta la emergencia de los juveniles infectivos (Figura 10) (Kaya y Stock, 1997).

Figura 10. Tiempos de infección de larvas *G. mellonella* en muestras de suelo colectadas para la obtención de NEPs.

CAPÍTULO II. BIOPROSPECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE NEMÁTODOS ENTOMOPATÓGENOS EN EL ESTADO DE YUCATÁN.

INTRODUCCIÓN

En un esfuerzo por aislar agentes entomopatógenos más eficaces se realizan colectas alrededor del mundo mediante la técnica de insecto trampa que consiste en usar a la *Gallería mellonella* como cebo en suelos al azar. Dicha técnica fue desarrollada por Bedding y Akhurst (1975), y facilita la colecta de nemátodos entomopatógenos para conocer su distribución geográfica. Se ha demostrado que los NEPs son comunes y se encuentran ampliamente distribuidos en todos los suelos de los continentes, incluso en el desierto (Grewal y Georgis 1999). Únicamente en la Antártida no existe evidencia de su existencia (Hominick, 2002). Es posible que muchas especies adicionales puedan ser descubiertas, debido a la aplicación de esta metodología práctica para encontrar especies de nemátodos adaptados localmente (Kaya et al., 2006).

Los steinernemátidos son biológicamente más diversos y se han encontrado principalmente en países con clima templado, en comparación con los heterorhabdítidos que están distribuidos en los trópicos y subtrópicos. La supervivencia, reproducción y desarrollo de los nemátodos depende de las condiciones ambientales de su hábitat, ya que la cepa más adaptada al medio es la que tendrá mayor éxito parasitario.

Las características del suelo como nutrientes, pH, textura y humedad asociados a la presencia o ausencia de NEPs, podría contribuir al entendimiento de la supervivencia y distribución de estos organismos (Alekseev et al., 2006; Kanga et al., 2012). Aunque estos factores pueden variar con la especie de nemátodo, se sabe que existe mayor prevalencia en suelos ácidos (Hatting et al., 2009). La mayor parte de la península lo conforma una llanura que se formó como producto de la aparición de una plataforma marina compuesta por roca calcárea (que contiene carbonato de calcio), lo que lo hace un suelo poco profundo (20 cm). El pH de los

suelos esta entre 6.5 a 7.5 predominando el suelo arcilloso. Las características particulares de los suelos de la Península de Yucatán pueden determinar la diversidad de NEPs. Actualmente, se han reportado 100 especies del género *Steinernema* y 26 especies del género *Heterorhabditis* (Malan et al., 2014) los cuales han sido aplicados principalmente en agricultura y en el área de la salud. Sin embargo, los estudios de diversidad y patogenicidad de NEPs así como su bacteria simbionte son limitados en México. En el estado de Yucatán, no existen trabajos previos en los que respecta a la diversidad de estos nemátodos ni en cuanto a su distribución geográfica ni sobre las condiciones ambientales en las que habitan.

Hipotesis

La presencia o ausencia de NEPs esta determinada por las caracteristicas particulares de los suelos de la peninsula de yucatán.

Objetivo general

Explorar la diversidad de nemátodos entomopatógenos y conocer los factores que determinan la presencia o ausencia de estos organismos en el suelo del estado de Yucatán.

MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis de suelo

Para los análisis físico-químicos del suelo se tomó una muestra compuesta (cuatro submuestras, cada una de 250 kg) las cuales se pesaron y etiquetaron. Las muestras fueron llevadas al "Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas y Agua" (LASPA) de la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY) donde se realizaron los siguientes análisis: tamaño de partícula con un densímetro, (Gee and Bauder, 1986); REDOX y pH por un potenciómetro (Patrick et al., 1996) fosforo por el método Olsen (Kuo, 1996); materia orgánica por determinación de colorimetría (Nelson y Sommers, 1996) y conductividad eléctrica por potenciómetro (Rhoades 1996). Se utilizó la prueba t de Student para determinar las diferencias de las características fisicoquímicas entre las muestras de suelo NEP positivo y NEP negativo ($p \leq 0.05$).

Identificación morfológica de nemátodos

La identificación de machos, hembras y juveniles fue hecha con base en las características morfométricas y proporciones usadas para la identificación de nemátodos que son L= longitud total del cuerpo; a= longitud total del cuerpo / anchura mayor del cuerpo; b= longitud total del cuerpo / distancia de la cabeza al esófago; c= longitud total del cuerpo / longitud de la cola; V= distancia desde la parte anterior hasta la vulva / longitud del cuerpo x 100; EP= distancia de la cabeza al poro excretor; NR= distancia de la cabeza al anillo nervioso; ES= distancia de la cabeza a la base del esófago; D% = distancia de la cabeza al poro excretor / longitud de la cola x 100; E% =distancia de la cabeza al poro excretor / longitud de la cola x 100; SW% = longitud de la espícula / diámetro del cuerpo a nivel del ano x 100; GS% = longitud del gubernáculo / longitud de la espícula x 100 (Nguyen, 1996; Poinar, 1990). Posteriormente, se capturaron imágenes con la cámara del microscopio de luz para la identificación de las estructuras de los nemátodos. Estas estructuras se midieron con el programa Imagej (Abramoff et al., 2004) el cual se calibró con el micrómetro del microscopio.

Reacción en cadena polimerasa y secuenciación de NEPs

Para la extracción de ADN, se cortaron dos nemátodos adultos en pequeños trozos utilizando un bisturí estéril para reducir el tiempo de lisis celular según el protocolo del kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen™). La región ITS y el gen 28S del ADN ribosomal fueron amplificados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para la mezcla de PCR en cada tubo agregamos lo siguiente: 12,5 µl de Green GoTaq Master Mix (Promega, Madison, WI, EE. UU.), 1 µl de cada cebador (10 µm), 8,5 µl de agua destilada y 2 µl de ADN genómico para un volumen final de 25 µl. Los cebadores utilizados en este estudio para ITS fueron el TW81 directo 5-GTTTCCGTAGGTGAACCTGC-3, más el inverso AB28 5-ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3 (Nthenga et al., 2014). Para el gen 28S rRNA se utilizaron los primers 391F 5′-AGCGGAGGAAAAGAAACTAA-3′ (Nadler y Hudspeth, 1998) y 536R 5′-CAGCTATCCTGAGGGAAAC-3′ (García-Varela y Nadler, 2005). Todas las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Axygen® MaxyGene™ II. Para ITS se utilizaron las siguientes condiciones de amplificación: un ciclo de predesnaturalización a 94°C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 92°C durante 30 segundos, hibridación a 47°C durante 45 segundos, extensión a 72 °C por 90 segundos y finalmente una extensión a 72°C por 10 minutos. Posteriormente, se utilizaron las siguientes condiciones de amplificación para la PCR 28S: un ciclo de pre-desnaturalización a 94°C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C, hibridación a 50°C y extensión a 72°C por 1 minuto cada temperatura y luego una extensión final a 72°C por 10 minutos. Los productos de PCR se verificaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1 % con tampón TAE 1X a 90 V durante 45 min en un sistema de electroforesis en gel de agarosa BioRad Sub-Cell®GT utilizando un marcador de ADN Promega® de 1 KB de peso molecular como referencia. Los productos de PCR se visualizaron en un BioDoc-It® Imager. Los productos de PCR fueron secuenciados comercialmente por GENEWIZ (South Plainfield, NJ, EE. UU.). Posteriormente, las secuencias consenso de ITS y 28S se alinearon con las secuencias obtenidas para cada primer usando Geneious Pro-4.8.4® (Biomatters

Ltd.). Las secuencias de consenso de cada nemátodo se depositaron en la base de datos GenBank con los números de acceso MW729401 a MW729412.

Análisis filogenético de NEPs

Las secuencias consenso del gen ITS y 28S rRNA de los especímenes fueron sometidas a alineamiento BLAST (Altschul et al., 1990) contra la base de datos de nucleótidos del Centro Nacional de Biotecnología e Información (NCBI). Posteriormente, las secuencias generadas en este estudio se alinearon con secuencias disponibles en GenBank pertenecientes a otras especies de *Heterorhabditis*. Se generaron dos conjuntos de datos, uno para ITS y otro para 28S. Se utilizó *Heterorhabditidoides* como grupo externo. El alineamiento de cada conjunto de datos se realizó con ClustalW (Thompson, Higgins y Gibson, 1994), implementado en el sitio web http://www.genome.jp/tools/clustalw/, con el enfoque 'SLOW/EXACTO' y matriz de peso 'CLUSTALW (PARA ADN)'. Los extremos de la alineación se recortaron para que coincidieran con la longitud de nuestras secuencias. El modelo de sustitución de nucleótidos se estimó con el programa jModelTest v2 (Darriba et al., 2012). El análisis filogenético se realizó bajo Máxima Verosimilitud (ML) con RAxML v. 7.0.4 (Stamatakis, 2006). Se realizó un primer análisis filogenético con Raxml para descartar secuencias de GenBank que pudieran tener problemas de identificación taxonómica en cada conjunto de datos. Luego, se realizó un segundo análisis filogenético con 10 repeticiones y 1000 repeticiones de arranque para obtener la mejor hipótesis filogenética de los conjuntos de datos ITS y 28S. Los árboles ML se visualizaron en FigTree v.1.4.3. (Rambaut, 2016). La variación molecular de los conjuntos de datos de 28S se estimó utilizando distancias p no corregidas (distancias p) con el software MEGA v.6 (Tamura et al., 2013).

RESULTADOS

De los 12 sitios de colecta en el estado de Yucatán, 4 resultaron positivos para NEPs (Cansahcab, Sucila, Tikuch y Dzan) (Figura 11). De las 144 muestras de suelo, 6

aislamientos resultaron positivos para nemátodos de la familia Heterorhabditidae (4.16%). La mayoría de los nemátodos fueron aislados de Dzan, Yucatán. Con base en el análisis de la secuencia de nucleótidos de 28S e ITS, concluimos que 4 aislamientos pertenecían a la especie *Heterorhabditis indica*, un aislamiento a *Metarhabditis rainai* y 2 aislamientos a *Heterorhabditis* n. sp.

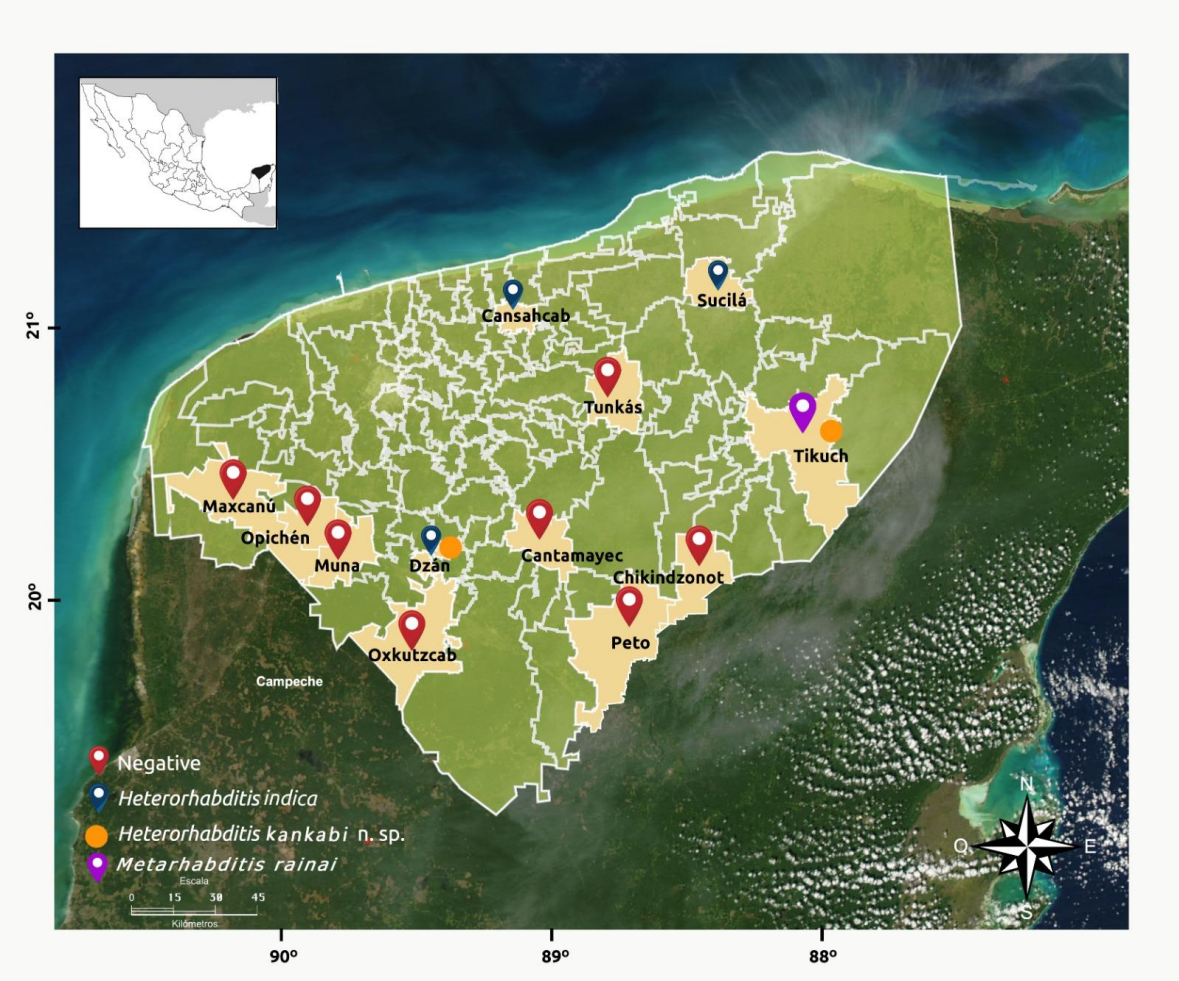

Figura 11. Mapa de sitios de suelos en localidades del estado de Yucatán. Los puntos de obtención de muestras están señalizados según la presencia o ausencia de NEPs. Los sitios de muestreo marcados con rojo denotan ausencia de EPN, mientras que los sitios de muestreo marcados con azul, amarillo y morado fueron positivos para EPNs.

Análisis de suelo

Heterorhabditis indica, *Heterorhabditis* n. sp. y *Metarhabditis rainai* se encontraron en suelos utilizados para agricultura y ganadería. Las características del suelo de las localidades donde se encontraron y no se encontraron estos nemátodos se presentan en la tabla 6. Aparentemente, las características relevantes para la presencia de nemátodos en el suelo fueron variables químicas como el potasio y el calcio, y el pH (Ver tabla 7). No se encontraron diferencias significativas en variables como P (mg/kg), % de MO y tipo de suelo entre las muestras positivas y negativas ($P > 0,05$).

Tabla 6. Media de los parámetros del suelo medidos con la presencia y ausencia de NEPs del estado de Yucatán

Genero/Especie	Localidad	Coordenadas geográficas	Tipo de suelo	Materia organica (%)	pH	Uso de suelo	Potasio (Cmol(+)/kg)	Calcio (Cmol(+)/kg)	Phosphorus (mg/kg)
Heterothabditis indica	Cansahcab	21°9'16.02" N 89°5'26.36" O	Franco arcillo arenoso	12.7	8.0	Ganaderia	1.5	53.8	133.6
H. indica	Sucila	21°8'58.98" N 88°18'22.04" O	Franco arcillo arenoso	7.5	7.9	Ganaderia	2.3	24.6	89.9
H. indica / *Heterorhabditis* n. sp.	Dzan	20°22'36.1" N 89°27'2.6" O	Franco arcillo arenoso	5.1	7.8	Agricultura	14.7	80.2	1.6
Heterorhabditis n. sp.	Ticuch	20°42'5.82" N 88°6'39.07" O	Franco arenoso	8.5	7.2	Ganaderia	0.3	17.0	0.02
Sin NEPs	Maxcanu	20°35'34.31" N 89°59'15.91" O	Franco arenoso	9.6	7.5	Industrial	2.5	43.3	58.6
Sin NEPs	Opichen	20°33'17.34" N 81°51'51.50 "	Franco arenoso	9.1	7.8	Forestal	3.0	46.0	801.1
Sin NEPs	Muna	20°29'16.34" N 89°43'36.18" O	Franco arenoso	12.4	7.4	Industrial	2.2	37.8	4.1
Sin NEPs	Oxkutzcab	20°19'1.00" N 89°25'52.79" O	Arcilloso	4.8	7.4	Agricultura	1.5	15.6	38.2
Sin NEPs	Tunkas	20°54'5.45" N 88°44'41.77"O	Franco arenoso	9.5	7.8	Agricultura	1.5	52.4	2430.5
Sin NEPs	Chikindzonot	20°19'39.40" N 88°29'23.66" O	Arcilloso	5.7	7.9	Forestal	2.3	30.2	0.3
Sin NEPs	Peto	20°06'25.4" N 88°52'45.6" O	Arcilloso	8.1	7.6	Forestal	1.7	33.4	2.2
Sin NEPs	Cantamayec	20°28'38.40" N 89°4'43.62" O	Franco arenoso	0.8	7.7	Agricultura	0.5	26.1	1.3

.

Tabla 7. Diferencia entre las medias de los parámetros de muestras de suelo con presencia y ausencia de NEPs. N1; total de muestras con NEPs, N2; total de muestras sin NEPs, T; T- student de 2 colas para comparación de medias.

Parámetro	Grupo 1	Grupo 2	N1	N2	Media (1)	Media (2)	Media (1) – Media (2)	T	*P* value
Fosforo (mg/kg)	NEPs	Sin NEPs	16	40	70.37	417.07	-346.70	-1.95	0.0575
Materia organica (%)	NEPs	Sin NEPs	16	40	8.48	7.55	0.93	0.87	0.3906
Arena (%)	NEPs	Sin NEPs	16	40	45.99	42.29	3.70	0.70	0.4889
Limo (%)	NEPs	Sin NEPs	16	40	15.63	16.45	-0.82	-0.41	0.6830
Arcilla (%)	NEPs	Sin NEPs	16	40	38.39	41.26	-2.88	-0.56	0.5752
Potasio (Cmol(+)/kg)	NEPs	Sin NEPs	16	40	5.86	1.94	3.92	2.50	0.0247
pH	NEPs	Sin NEPs	16	40	7.88	7.69	0.19	2.43	0.0183
Calcio (Cmol(+)/kg)	NEPs	Sin NEPs	16	40	50.64	35.65	14.99	2.29	0.0337

Resultados taxonómicos

En este trabajo se lograron aislar 3 distintas especies de nemátodos, la primera fue *Heterorhabditis* n. sp. que fue caracterizado por hembras amfimicticas, hembras hermafroditas e infectivos juveniles. Ejemplares machos no fueron encontrados a pesar de múltiples esfuerzos de colecta e infecciones de larvas de *G. mellonella*. La segunda especie aislada fue *Metharabditis rainai* la cual fue caracterizada morfológicamente solo por ejemplares machos, ya que no se encontraron otros estadios dentro del hospedero. La tercera especie identificada fue *H. indica*, la cual fue identificada molecular y filogenéticamente. No se incluye su descripción morfológica dado que es una especie muy bien descrita en la literatura.

Las 3 especies registradas en este trabajo fueron corroboradas molecularmente y por filogenia. A continuación, se describen los estadios encontrados de cada especie.

Descripción taxonómica de *Heterorhabditis n. sp.*:

Familia: Heterorhabditidae, Poinar 1976.

Género: *Heterorhabditis,* Poinar 1976.

Heterorhabditis n. sp. Ávila-López, Hernández-Mena and Vidal-Martínez, 2023 (en revisión) (Figura 12).

Diagnóstico morfológico:

Hembra anfimíctica (tabla 8): Medidas basadas en 10 ejemplares. Hembras con una longitud media de 1028.00 ± 87.50 (880.00 – 1175.00) µm, 63.00 ± 10.00 (50.00 – 80.00) µm de ancho y 199.20 ± 11.80 (182.50 −220.00) µm de longitud del esófago. Las hembras inmaduras exhibieron ovocitos, las hembras grávidas tuvieron huevos embrionados y larvas vivas. Cutícula lisa al microscopio electrónico de barrido, cabeza truncada, región labial con seis labios cónicos separados, cada labio con una papila labial terminal, con papilas cefálicas dobles muy pequeñas en la base de los labios observadas al microscopio electrónico de barrido (Figura 12). En vista

apical, la boca tenía forma hexagonal. Apertura anfidial circular. Estoma tubular en forma de embudo, más largo que ancho con cheilorhabdiones. Esófago musculoso con cuerpo cilíndrico. Istmo largo y visible. Anillo nervioso en la parte distal del istmo. Bulbo basal prominente con cámara de bombeo. Poro excretor a nivel de la base del bulbo basal. Células intestinales prominentes, especialmente entre el bulbo basal y el ovario anterior, y entre el recto y el ovario posterior. Luz intestinal definida. El aparato reproductor exhibió dos ovarios anfidelfa Vulva ubicada pasando la primera mitad anterior al cuerpo (V = 61.80 ± 7.70 [50.00 – 80.00%]). No se observaron fásmidios. Cola conoide.

Hembra hermafrodita:

Las hembras hermafroditas fijadas adquirieron forma de 'C'. La forma del cuerpo era igual al de la hembra anfimíctica, pero más grande. Cuerpo robusto, con una longitud corporal media de 2893.70 ± 597.00 (2200.00−3750.00) µm y un ancho de 146.60 ± 27.90 (100.00 – 125.00) µm. El poro excretor tenía una distancia media al extremo anterior de 205.30 ± 33.10 (142.00 – 242.00) µm, situado a la altura de la base del bulbo basal. Vulva elíptica y protuberante, con distancia al extremo anterior de 50.70 ± 5.70 (42.10 – 61.80) µm. No se observaron fasmídios. Cerca del extremo posterior, la cola se ensanchaba y reducía de tamaño terminando en una punta afilada. Protuberancia anal presente.

Infectivo juvenil:

Cuerpo alargado, con longitud de 545.00 ± 95.00 (420.00 – 685.00) µm y ancho de 26.00 ± 4.00 (20.00 – 35.00) µm. Región cefálica sin papilas y pequeño anfidio. Región labial con presencia de una protuberancia cuticular que asemeja a un diente dorsal con el que rompe la cutícula del huésped, con siete anillos transversales, seguida de una cutícula con aspecto de mazorca. Fisuras longitudinales desde el poro excretor. Esófago e intestino delgado. Poro excretor a nivel de la base del bulbo basal. No se observaron fasmídios. Cola larga y conoide.

Tabla 8. Morfometría de *Heterorhabditis* n. sp. de Tikuch, Yucatán. Medidas en µm de la siguiente

Carácter	Hermafrodita	Hembra	Infectivo juvenil
N	10	10	10
L	2893.70 ± 597.00	1028.00 ± 87.50	545.00 ± 95.00
	(2200.00 – 3750.00)	(880.00 −1175.00)	(420.00 – 685.00)
a	20.00 ± 3.60	16.80 ± 3.50	20.00 ± 1.80
	(14.20 – 25.00)	(12.20 – 21.50)	(18.00 – 24.00)
b	13.00 ± 2.20	5.10 ± 0.30	3.80 ± 0.30
	(10.40 – 16.30)	(4.60 – 5.60)	(3.00 - 4.40)
c	-	-	6.50 ± 0.90
	-	-	(5.20 − 8.90)
v	50.70 ± 5.70	61.80 ± 7.70	-
	(42.10 – 61.80)	(50.00 – 70.40)	-
Anchura mayor del cuerpo (D)	146.60 ± 27.90	63.00 ± 10.00	26.00 ± 4.00
	(100.00 – 125.00)	(50.00 – 80.00)	(20.00 – 35.00)
Longitud del estoma	12.00 ± 3.20	40.60 ± 4.30	-
	(9.00 – 18.00)	(34.00 – 50.00)	-
Ancho del estoma	9.30 ± 1.60	2.70 ± 0.20	-
	(8.00− 12.00)	(2.50 − 3.20)	-
EP	205.30 ± 33.10	175.00 ± 19.50	119.00 ± 19.00
	(142.00 – 242.00)	(145.00 – 210.00)	(85.00 – 159.00)
NR	132.30 ± 12.00	171. 30 ± 20.40	98.00 ± 19.00
	(110.00 – 145.00)	(137.50 – 170.00)	(71.90 – 134.00)
ES	221.10 ± 16.60	199.20 ± 11.80	143.00 ± 23.00
	(195.00 – 245.00)	(182.50 – 220.00)	(95.00 – 177.00)

forma: promedio ± D.S. (rango).

Continuación tabla 8

Carácter	Hermafrodita	Hembra	Infectivo juvenil
Longitud de la cola con vaina	100.70 ± 12.90	106.00 ± 11.40	66.00 ± 12.90
	(86.00 – 125.00)	(80.00 – 125.00)	(50.00 – 86.00)
Diametro del cuerpo anal (ABD)	48.60 ± 6.30	34.80 ± 8.60	18.90 ± 5.60
	(40.00 – 58.00)	(25.00 – 50.00)	(13.00 – 29.00)
D % = EP/ES x 100	-	-	83.70 ± 5.80
	-	-	(71.60 − 89.80)
E % = EP/T x 100	-	-	143.80 ± 20.00
	-	-	(109.50 − 178.80)

n= número de especímenes medidos; L = longitud total del cuerpo; a = largo total del cuerpo/ancho máximo del cuerpo; b = longitud corporal total/distancia desde la cabeza hasta el esófago; c = longitud total del cuerpo/longitud de la cola; D = mayor ancho del cuerpo; V= distancia de la cabeza a la vulva / longitud del cuerpo x 100; EP = distancia de la cabeza al poro excretor; NR = distancia de la cabeza al anillo nervioso; ES = distancia de la cabeza a la base del esófago.

Tabla 9. Morfometría del juvenil infectivo *Heterorhabditis* n. sp. en comparación con otras especies de *Heterorhabditis*. Medidas en µm de la siguiente forma: promedio ± D.S. (rango).

ESPECIES	L	a	b	c	D	EP	NR	ES	T	ABD	D%	E%
AMA	589 ± 12 (567 – 612)	26 ± 1 (24 – 29)	4.9 ± 0.3 (4.4 – 5.5)	5.5 ± 0.2 (5.1 – 6.1)	23 ± 1 (20 – 24)	107 ± 6 (89 – 115)	85 ± 5 (76 – 93)	121 ± 6.6 (107 – 132)	107 ± 5 (98 – 115)	14 ± 1.4 (13 - 17)	14 ± 2.7 (83 – 92)	100 ± 6 (89 – 109)
BAC	558 (512 – 671)	25 (17 – 30)	4.5 (4 – 5.1)	6.2 (5.7 – 7)	23 (18 – 31)	103 (87 – 110)	85 (72- 93)	125 (10 – 139)	98 (83 – 112)	- (-)	84 (76 – 92)	112 (103 – 130)
BAU	551 ± 27 *(497-595)*	28 ± 1 (26 – 30)	4.8 ± 0.2 (4.5 – 5.1)	6 ± 0.3 (6 – 6.7)	20 ± 2 (18 – 22)	97 ± 3 (91 -103)	81 ± 3 (75 – 86)	115 ± 3 (107 – 120)	90 ± 4 (83 – 97)	13 ± 0.7 (11 – 14)	84 ± 3 (78 – 88)	108 ± 4 (98 – 114)
DOW	637 ± 32 (588 – 692)	35 – 4 (29- 42)	4.7 ± 0.3 (4.4 – 5.3	9.5 ± 5 (8.5 – 10.5)	18.2 ± 2 (15 – 22)	115 ± 8 (96 – 128)	101 ± 3 (96 – 105)	131 ± 4 (126 -141)	69 ± 4 (62 – 74)	12 ± 1 (9 – 14)	85 ± 5 (78 — 98)	170 ± 10 (100 – 180)
FLO	562 ± 24 (554 – 609)	28 ± 5 (25 – 32)	4.3 ± 2.1 (3.9 – 4.9)	5.6 ± 2.4 (5.3 – 6.6)	21 ± 5 (19 - 23)	100 ± 10 (101 - 122)	86 ± 9 (68 - 107)	135 ± 11 (123- 1 42)	103 ± 10 (91 - 113)	14 ± 3.7 (12 - 16)	81 ± 8.9 (71 - 90)	105 ± 10 (95 - 134)
GEO	598 ± 27 (547 - 651)	27 ± 3 (23 - 34)	4.7 ± 0.3 (4.1 – 5.3)	6.1 ± 0.4 (5.5 – 6.9)	22 ± 2 (17 - 26)	104 ± 4 (97 - 113)	85 ± 5 (74 - 94)	127 ± 7 (110 - 139)	98 ± 5 (86 - 108)	15 ± 1.5 (13 - 17)	- (70 - 93)	107 ± 8 (95 – 117)
GER	604 ± 39 (551 – 683)	13 ± 3 (23 - 32)	0.21 ± 0.02 (0.14 - 0.23)	0.17 ± 0.03 (0.11 – 0.21)	23 ± 3 (18 - 29)	98 ± 6 (92 - 111)	93 ± 18 (81 – 111)	124 ± 5 (110 - 130)	102 ± 14 (76 - 141	15 ± 2.9 (12 – 21)	80 ± 0.5 (73 - 92)	99 ± 2 (73 – 138)
IND	528 ± 26 (479 – 573)	26 ± 4 (25 - 27)	4.5 ± 0.34 (4.3 – 4.8)	5.3 ± 0.5 (4.5 – 5.6)	20 ± 6 (19 – 22)	98 ± 7 (88 – 107)	82 ± 4 (72 -85)	117 ± 3 (100 – 123)	101 ± 6 (93 - 109)	- -	84 – 5 (79 – 90)	94 ± 7 (83 - 103)
KAN	**555 ± 95 (420 – 685)**	**20 ± 1.8 (18 – 24)**	**3.8 ± 0.3 (3 – 4.4)**	**6.5 ± 0.9 (5.2- 8.9)**	**26 ± 4 (20 - 35)**	**119.9 ± 19 (85 - 159)**	**98 ± 19 (71.9 -134)**	**143 ± 23 (95 - 177)**	**66 ± 12.9 (50 - 86)**	**18.9 ± 5.6 (13 - 29)**	**83.7 ± 5.8 (71.6 – 89.8)**	**143.8 ± 20 (109.5 – 178.8)**
MEX	578 ± 23 (530 - 620)	26 (23 - 28)	4.6 (4.2 – 5.1)	5.9 (5.5 – 6.3)	23 ± 1 (20 - 24)	102 ± 5 (83 - 109)	81 ± 4 (74 - 88)	122 ± 27 (104 – 142)	90 ± 4 (91- 106)	15 ± 1.2 (12- 17)	81 ± 3 (72 - 86)	104 ± 5 (87 - 111)
NOE	536 ± 21 (484 - 578)	21 ± 1 (21 27)	4.9 ± 0.2 (4.3 – 5.2)	6.2 ± 0.3 (5.5 – 6.8	23 ± 1 (21 - 25)	97 ± 3 (88 - 105)	81 ± 6 (69 - 96)	106 ± 9 (79 - 96)	86 ± 3.4 (78 - 95)	14 ± 1 (12 - 16)	89 ± 3 (81 - 95)	113 ± 6 (99 - 125)
SAF	600 ± 27 (550 - 676)	29 ± 2 (21.8 – 31.8)	4.5 ± 0.2 (3.9 – 4.9)	6.4 ± 0.6 (5.4 – 7.5)	21 ± 1 (19 - 23)	110 ± 4 (103 - 122)	93 ± 4 (86 - 101)	131 ± 3.7 (125 - 141)	93 ± 6 (86 - 108)	13 ± 0.6 12 - 14	84 ± 2.6 (80 - 90)	19 ± 9 (99 - 133)
SON	557 ± 28 (495 - 570)	23 ± 1.5 (19 – 26)	4.8 ± 0.4 (4.4 – 5.4)	5.5 ± 1 (4 – 6.5)	26 ± 4 (19 - 32)	99 ± 5 (97 - 116)	93 ± 4 (87 - 98)	119 ± 7 (110 - 131)	105 ± 7 (91 - 125)	16 ± 2 (13 - 16)	90 ± 8.5 (78 - 110)	99 ± 8 (81 - 111)
TAY	418 ± 38 (648 - 736)	21 ± 2 (38 - 48)	3 ± 0.2 (78 - 120)	7 ± 0.7 (54 - 88)	20 ± 2 (85 -123)	90 ± 9 (20 - 29)	74 ± 7 (21 - 30)	110 ± 8 (30 - 27)	55 ± 7 (14 - 21)	- -	83 ± 6 (71 - 96)	180 ± 27 (110 - 230)

L = longitud total del cuerpo; a = largo total del cuerpo/ancho máximo del cuerpo; b = longitud corporal total/distancia desde la cabeza hasta el esófago; c = longitud total del cuerpo/longitud de la cola; D = mayor ancho del cuerpo; V= distancia de la cabeza a la vulva / longitud del cuerpo x 100; EP = distancia de la cabeza al poro excretor; NR = distancia de la cabeza al anillo nervioso; ES = distancia de la cabeza a la base del esófago; T = distancia del ano a la punta de la cola con vaina; ABD = diámetro del cuerpo anal; D% = distancia de la cabeza al poro excretor/distancia de la cabeza a la base del esófago x 100; E% = distancia de la cabeza al poro excretor/longitud de la cola x 100; AMA= *H. amazonensis*; BAC= *H. bacteriophora*; BAU= *H. baujardi*; DOW= *H. downesi*; FLO= *H. floridensis*; GEO= *H. georgiana*; GER= *H. gerrardi*; IND= *H. indica*; KAB= *H. kankabi*; MEX= *H. mexicana*; NOE= *H. noenieputensis*; SAF= *H. safricana*; SON= *H. sonorensis*; TAY= *H. taysearae.*

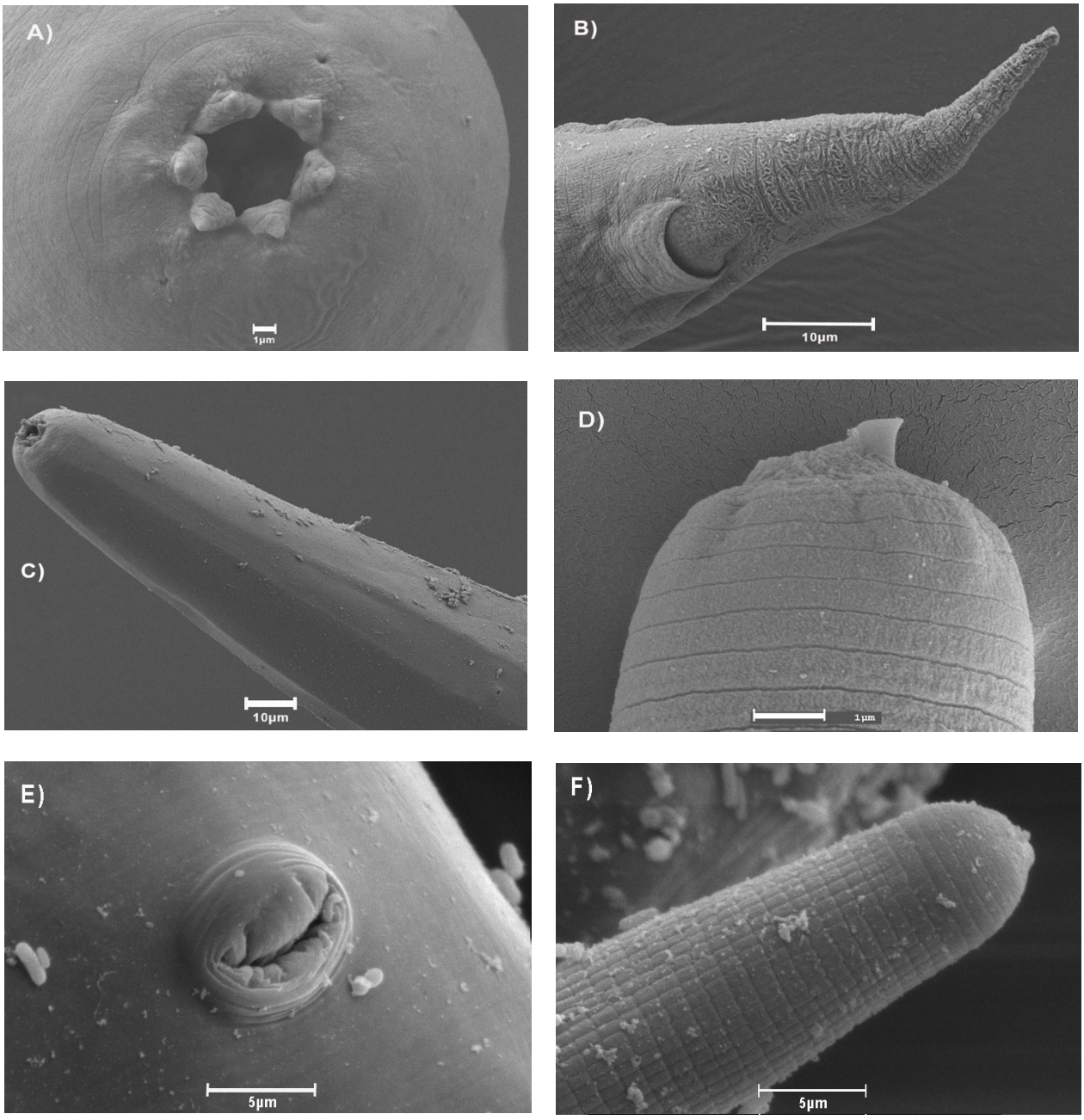

Figura 12. *Heterorabditis* n. sp. Fotografías SEM. A, Cabeza de hembra anfimíctica con seis papilas labiales y un anfidio en cada lado (aumento 5000x); B, Región posterior de nemátodo hermafrodita que muestra el área anal y la punta de la cola (aumento de 2500x); C, Región anterior del nemátodo donde se observa el poro excretor en hermafrodita (aumento 1.000x); D, juvenil infectivo con protuberancia cuticular en forma de cuña y cutícula estriada del segundo estadio (aumento 5,000x); E. Región vulvar protuberante ubicada en la parte media de la hermafrodita (aumento 5.000x); F, Región anterior de un nemátodo envainado que muestra el cuerpo con un patrón teselado (aumento de 5000x) (Micrografías realizadas en el SEM del CINVESTAV, Unidad MERIDA).

Diagnóstico genético:

ITS: >Heterorhabditis_kankabi_Contig_1000_ITS
GCAGATGGATCATCGTCGATACCTTATAGGTATATGCTTTGATCACGAGA
TGCTGATAATCATGGAATCAAGCTTGTTCTTGATTTCAGTCGGTGTCTCA
CCCCATCTAAGCTCTCGGAGAGGTGTCTATTCTTGATTGGAGCCGATTTG
AGTGACGGCAATGATAATTGGGTATGCTCCCGTTCGGATAAGAGCATAAG
ACTTAATGAGCTGATCTAGGTCTGTCGCCTCACCAAAAACCCATCGATAG
TTGGTGGCTAAGTGATGAGACTTTGTCAAAATCACTAATCTGCTATGCGG
GGAGCCTTAATGAGTTGTTCGTGTCACTTGACCGAGACAACCGCCAGTAT
CGATAAATCTCTTCCCAATTAACTTGTTTCTAGTAAAGGCTATTGAGTTA
GTGGAACATTAGCCTTAGCGATGGATCGGTTGATTCGCGTATCGATGAAA
AACGCAGCAAGCTGCGTTATTTGCCACGAATTGCAGACGCTTAGAGTGGT
GAAATTTTGAACGCACAGCGCCGTTGGGTTTTCCCTTCGGCACGTCTGGC
TCAGGGTTGTTTAATAGACTTCGGTATTGCTTGGAAGGCGGCAATACCGT
GAACCAAACGGTGATAGTGTCTAGAATATGTGGTGCATGCCCCGTTACAG
GGGAGAATGGTGGTTAAATGAATTTCTCTTAACGCCGGAGAAATATTAGG
TTTCACTTATGGATATGCCATGTATGAAATACGACGTGGTTATATACATA
AATCGTGTTTCCTATAAGTCTCATTATGCAACCTGAGCTCAGTCG

28S: >Heterorhabditis_kankabi_Contig_999
GCGAATGAAAGGGGAAGAGCCCAGCGCTGAATCTCTCGGTATGCAGCCGC
TGAGAACTGTAGCGTATAGGTGTGACTGTCCTGCTATATTGCATTTCCGA
AGTCTCTTTGATAGGGGCCAACATCCATAGAGGGTGCGAGACCTGTACGG
AAAGTAGTGTAGTTGGTATGGTTACTCCTTGGAGTCGGGTTGCTTGAAAG
TGCAGCCTAAAGTGGGTGATAAACTTCATCTAAGGCTAAATATCGACGCG
AAATCGATAGCAAACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTGCAAAGAACTTTGAA
GAGAGAGTTCAAGAGAACGTGAAATCGCTGAAGTGGAACCGGAGAGAGTT
AACATAACTTGGTAGCTATATCCTCTATGGTCGCTTAACTGTGGCTTTGG
GGGGTGGACGCTACCTGTTGTTGCACTGACTGCGTTGATCATGCTTTCCG
AACAATGTAGTGTTGCCCACATTGTGGTGTCTTGCTTATTGGAAGGTTTG
TCATGGTTAACGTTAAGCCTTAGTCCCGAGGGAGTCAGTGTGAAAGTTAA
CCACCTTTCCGACCCGTCTTGAAACACGGACCGAGGAGTGTAATTTATAC
GCGAGTCAAAGGGATGGCAGACCCTATGGCTTAATGAAAGTAAAGGCCGG
TTAACCGGTTGACATGGGATCCGTCTGAACTTCTTCGAAACGGAGCACCA
TGGCCCTGTCTTGTCTGCTTGCAGATGGGCAGCGGTAGAGCGTGTAGGTT
GCGACCCGAAAGATGGTGAACTATGCTTGAGCAGGACGAAGCCAGAGGAA
ACTCTGGTGGAAGTCCGTATCGGTTCTGACGTGCAAATCGATCGATAGAC
TTGGGTATAGGGGCGAAAGACTAATCGAAC.

Resumen taxonómico:

Huésped tipo: *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1756) polilla de la cera (Lepidoptera: Pyralidae).

Sitio de infección: Cavidad corporal de larvas de *G. mellonella*

Localidad tipo: Tikuch, Yucatán, México (20°42'5.82" N, 88°6'39.07" O).
Otras localidades: Dzan, Yucatán, México (20°22'36.1" N, 89°27'2.6" O).
Tipo de material: holotipo CNHE 11662; Paratipos CNHE 11663-11666 (n=5).
Etimología: La nueva especie de *Heterorhabditis* descrita en esta tesis se presentará formalmente en un artículo científico y llevara el nombre de *kankabi,* palabra en maya que significa suelo amarillo (K'an: amarillo Kab: abajo) que hace referencia a un tipo de suelo de la península de Yucatán donde se aislaron los nemátodos.

Observaciones:

Las hembras hermafroditas exhibieron una morfología vulvar sobresaliente muy similar a la de *Heterorhabditis mexicana*. Sin embargo, *H. mexicana* tiene una longitud corporal mayor, es decir, 3516 ± 543 (2440 − 4606) µm en comparación con la descripción del nemátodo nativo *Heterorhabditis* n. sp., que tuvo 2,893.70 ± 597.00 (2,200.00 – 3,750.00) µm de longitud. Los caracteres morfométricos de la nueva especie fueron similares a los de *H. bacteriophora*, *H. baujardi*, *H. floridensis* y *H. indica*. La longitud del cuerpo del juvenil infeccioso de *Heterorhabditis* n. sp. fue similar a la de especies como *H. indica*, *H. noenieputensis*, *H. baujardi* y *H. sonorensis* (tabla 9). Sin embargo, el diámetro del cuerpo a nivel de la zona anal solo fue similar al de *H. taysearae* y *H. sonorensis* (tabla 9).

La longitud de la hembra hermafrodita de *Heterorhabditis* n. sp. fue de 2,893.70 ± 597.00 (2,200.00 – 3,750.00) µm, y la del anfimíctico de 1,028.00 ± 87.50 (880.00 – 1,175.00) µm, similar a la encontrada en ejemplares hembra de *H. baujardi*. En general, el esófago del nemátodo nativo fue más largo que el de otras especies reportadas (132.30 ± 12.00 [110.00 – 145.00] µm). La única especie similar fue *H. baujardi* (116.00 ± 10.00 [105.00 – 132.00] µm). Para *Heterorhabditis* n. sp., la única variabilidad morfológica encontrada en comparación con otras especies descritas fue la vulva protuberante y globosa en hermafroditas. En el caso de hembras anfimícticas y juveniles infectivos, no se encontraron diferencias morfológicas destacables.

Análisis filogenético de *Heterorhabditis* n. sp*.:*

Se obtuvieron cinco nuevas secuencias del gen 28S de diferentes etapas de desarrollo de la nueva especie, que tenían una longitud de 868-925 pb. El análisis filogenético se realizó con una matriz alineada de 935 pb de longitud y que contenía representantes de 16 especies de *Heterorhabditis*, mientras que el modelo de sustitución estimado para esta matriz fue el GTR.

El árbol obtenido tenía un valor de verosimilitud de −2090,969312. En el árbol, las especies se distribuyeron en 4 clados principales con altos valores de soporte (figura 13), a los que denominamos: mexicana (Bt= 98), Indica (Bt= 100), Megidis (Bt= 100) y Bacteriophora (Bt= 100). = 100). En el clado mexicana, *Heterorhabditis* n. sp., se anidaron con *H. floridensis*, *H. baujardi*, *H. amazonensis* y obviamente *H. mexicana*; en particular, la nueva especie fue agrupada como especie hermana de *H. mexicana* (Bt= 79). No hubo diferencia genética entre todos los especímenes de *Heterorhabditis* n. sp. La distancia genética entre las especies hermanas *Heterorhabditis* n. sp. y *H. mexicana* fue de 0.67%, y entre *Heterorhabditis* n. sp. y las demás especies del clado mexicana fue de 0.67 a 0.79%. Las distancias genéticas con las especies distribuidas en los otros tres grandes clados fueron las siguientes: 2.97% con el clado Indica; del 4.88 al 6.00 % con el clado Megidis; y de 4.68 a 5.10 % con el clado Bacteriophaga (tabla 10). Se obtuvieron cinco nuevas secuencias ITS de las mismas muestras de las que se obtuvo el 28S y tenían una longitud de 791-801 pb. El análisis filogenético se realizó con una matriz alineada de 1041 pb de longitud y que contenía representantes de 17 especies de *Heterorhabditis*; el modelo de sustitución estimado para esta matriz fue el GTR+GAMMA+I. El árbol obtenido tenía un valor de verosimilitud de −4155,806221. En el árbol ITS también se observaron los mismos 4 clados principales que se obtuvieron con 28S (Figura 13) con altos valores de soporte: mexicana (Bt= 100), Indica (Bt= 100), Megidis (Bt= 100) y Bacteriophora (Bt= 100). En el clado mexicana, *Heterorhabditis* n. sp., *H. floridensis*, *H. baujardi*, *H. amazonensis*, *H. mexicana* y adicionalmente también se anidaron con *H. taysearae*. *Heterorhabditis* n. sp. se agrupó como la especie hermana del clado formado *por H. mexicana* + *H. taysearae* con altos valores de apoyo (Bt=97).

En ITS tampoco hubo diferencia genética entre los especímenes de *Heterorhabditis* n. sp. Las distancias genéticas interespecíficas fueron mayores que en 28S: entre *Heterorhabditis* n. sp. con *H. mexicana* y *H. taysearae* fue de 1.22%, mientras que con las demás especies del clado mexicana fue de 0.66 a 1.66%. Las distancias entre la nueva especie con las especies de los otros tres clados principales fueron las siguientes: de 9.01 a 9.43% con el clado Indica; del 20.65 al 24.66% con el clado Megidis; y del 21.81 al 22.03% con el clado Bacteriophora (tabla 10).

Tabla 10. Distancias genéticas entre *Heterorhabditis kaankabi* n. sp. y las especies del género *Heterorhabditis* en los genes ribosómicos 28S e ITS. p= distancias p no corregidas (en %), N= número de nucleótidos diferentes (na= secuencias no disponibles en Genbank).

Especies	*Heterorhabditis kaankabi* n. sp.			
	28S		**ITS**	
	p	**N**	***p***	**N**
Heterorhabditis taysearae	na	na	1.22	11
Heterorhabditis mexicana	0.67	6	1.22	11
Heterorhabditis floridensis	0.67	6	0.66	6
Heterorhabditis baujardi	0.67	6	1.37	11
Heterorhabditis amazonensis	0.79	7	1.66	15
Heterorhabditis noenieputensis	2.92	26	9.43	83
Heterorhabditis indica	2.92	27	9.01	79
Heterorhabditis zealandica	5.77	51	24.66	215
Heterorhabditis megidis	6.00	53	22.45	194
Heterorhabditis downesi	na	na	21.69	187
Heterorhabditis safricana	5.20	46	22.03	191
Heterorhabditis marelatus	5.20	46	21.91	190
Heterorhabditis atacamensis	4.88	42	20.65	179
Heterorhabditis bacteriophora	4.68	42	21.81	193
Heterorhabditis georgiana	5.10	45	22.03	195
Heterorhabditis beicherriana	4.95	43	22.03	195

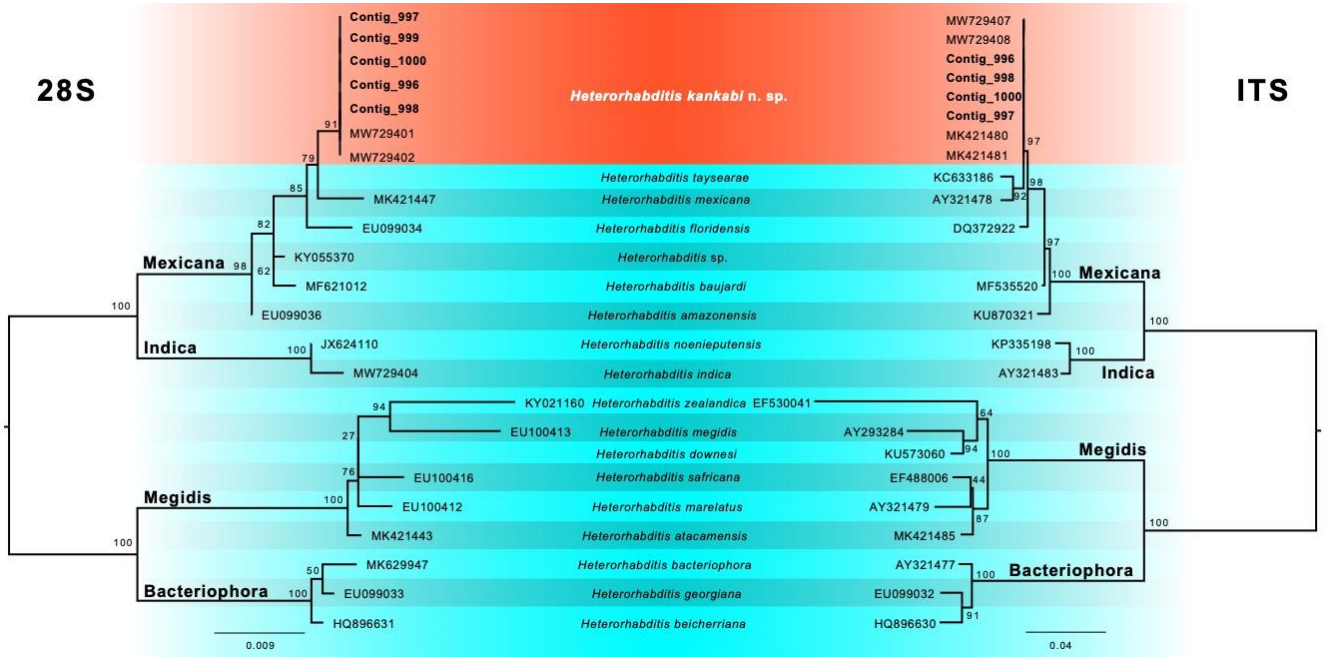

Figura 13. Relaciones filogenéticas de especies del género *Heterorhabditis* utilizando el método de máxima verosimilitud para generar los árboles filogenéticos. El árbol muestra ITS en el lado derecho y 28S en el lado izquierdo.

Taxonomía de *Metarhabditis:*

Familia: Rhabditidae, Örley 1880.

Género: *Metarhabditis* Tahseen et al., 2004

Metarhabditis rainai (Carta and Osbrink 2005) Sudhaus 2011

Descripción:

Machos (tabla 11). Se midieron 10 nemátodos machos con 812.00 ± 105.00 (650.00 – 980.00) µm de longitud corporal, 52.20 ± 7.90 (40.00 – 62.50) µm de ancho y 169.00 ± 19.00 (140.00 −197.00) µm de longitud de faringe. Longitud del estoma 13.80 ± 1.10 (12.50 – 15.00) µm y ancho del estoma 2.50 ± 0.10 µm. Faringe con cuerpo cilíndrico e istmo grande. El anillo nervioso está cerca del bulbo basal. Poro excretor a la altura del bulbo basal 184.00 ± 11.80 (162.00 – 202.00) µm. Un solo testículo retroflexo. Espículas pareadas cortas y separadas, con media de 39.70 ± 3.90 (32.50 – 47.50) µm. Gubernáculo ligeramente curvado ventralmente, forma de D 21.50 ± 7.60 (15.00 – 30.00) µm de longitud. Los especímenes machos de *M. rainai* tenían una bursa pelodera abierta de forma ovalada con ocho papilas genitales. La configuración del patrón de las papilas fue 1+2+3+2 (Figuras 14 y 15). Además, presentan un par de apéndices bifurcados muy pequeños debajo de la espícula, justo entre las papilas siete y ocho en vista ventral superficial (Figura 14).

∗ No se encontraron ejemplares hembras ni juveniles infectivos de *M. rainai* dentro del hospedero.

Tabla 11. Morfometría de *Metarhabditis rainai* de Tikuch, Yucatán. Medidas en µm de la siguiente forma: promedio ± D.S. (rango).

Carácter	Macho
N	10
L	812.00 ± 105.00
	(650.00 -980.00)
a	15.00 ± 3.40
	(11.60 – 24.50)
b	4.70 ± 0.63
	(3.80 – 6.30)
c	-
	-
v	-
	-
Anchura mayor del cuerpo (D)	52.20 ± 7.90
	(40.00 – 62.50)
Longitud del estoma	13.80 ± 1.10
	(12.50 – 15.00)
Ancho del estoma	2.50 ± 0.10
	--
EP	184.00 ± 11.80
	(162.00 -202.00)
NR	136.00 ± 10.70
	(115.00 – 155.00)
Es	169.00 ± 19.00
	(140.00 – 197.00)

Carácter	Macho
Testículo retroflexo	334.00 ± 58.70
	(255.00 – 450.00)
Longitud de la cola sin vaina	43.70 ± 4.30
	(24.40 – 37.00)
Diametro del cuerpo anal (ABD)	16.00 ± 1.50
	(15.00 – 19.00)
Longitud de la espícula (SP)	39.70 ± 3.90
	(32.50 – 47.50)
Ancho de la espícula	6.70 ± 1.10
	(5.00 – 7.50)
Longitud del gubernáculo (GU)	21.50 ± 7.60
	(15.00 – 30.00)
D % = EP/ES x 100	109.70 ± 8.30
	(96.20 – 126.30)
E % = EP/T x 100	-
	-
SW % = SP/ABD x 100	243.70 ± 11.40
	(229.00 – 258.00)
GS % = GU/SP x 100	54. 60 ± 22.00
	(30.70 – 87.50)

n = número de especímenes medidos; L = longitud total del cuerpo; a = largo total del cuerpo/ancho máximo del cuerpo; b = longitud corporal total/distancia desde la cabeza hasta el esófago; D = mayor ancho del cuerpo; EP = distancia de la cabeza al poro excretor; NR = distancia de la cabeza al anillo nervioso; ES = distancia de la cabeza a la base del esófago; T = distancia del ano a la punta de la cola con vaina; ABD = diámetro del cuerpo a la altura del ano; D% = distancia de la cabeza al poro excretor/distancia de la cabeza a la base del esófago x 100; E% = distancia de la cabeza al poro excretor/longitud de la cola x 100; SW% = longitud de la espícula/diámetro del cuerpo a la altura del ano x 100; GS% = longitud gubernáculo / longitud espícula x 100.

Comentarios de *Metarhabditis rainai:*

Carta y Osbrink (2005) reportaron por primera vez *M. rainai* (población LKC20), nemátodos aislados de termitas subterráneas de Formosa (*Coptotermes formosanus*) colectadas en Nueva Orleans, LA, EE. UU.

Los autores reportaron a *M. rainai* con longitud corporal de 1001.00 ± 83.00 (860.00 – 1169.00) µm. Esa longitud es mayor que la de los machos de *M. rainai* aislados en Tikuch, que fue de 812.00 ± 105.00 (650.00 – 980.00) µm. Sin embargo, el diámetro del nemátodo macho de la descripción original de *M. rainai* fue de 60.00 ± 9.00 (48.00 – 76.00) µm, similar a la de los ejemplares de Tikuch, es decir, 52.20 ± 7.90 (40.00 – 62.50) µm. La longitud de la espícula de la descripción original (49.00 ± 1.40 [46.00 – 52.00] µm) fue mayor que la de mis ejemplares: 39.70 ± 3.90 (32.50−47.50) µm. Los especímenes machos de los ejemplares de Tikuch tuvieron alas caudales con ocho pares de papilas pedunculadas, compartiendo el mismo patrón papilar que la descripción original (1−2−3−2) (Figuras 14 y15). Sin embargo, M. *rainai* difirió de la descripción original al exhibir un par de apéndices papilares adicionales (figura 14).

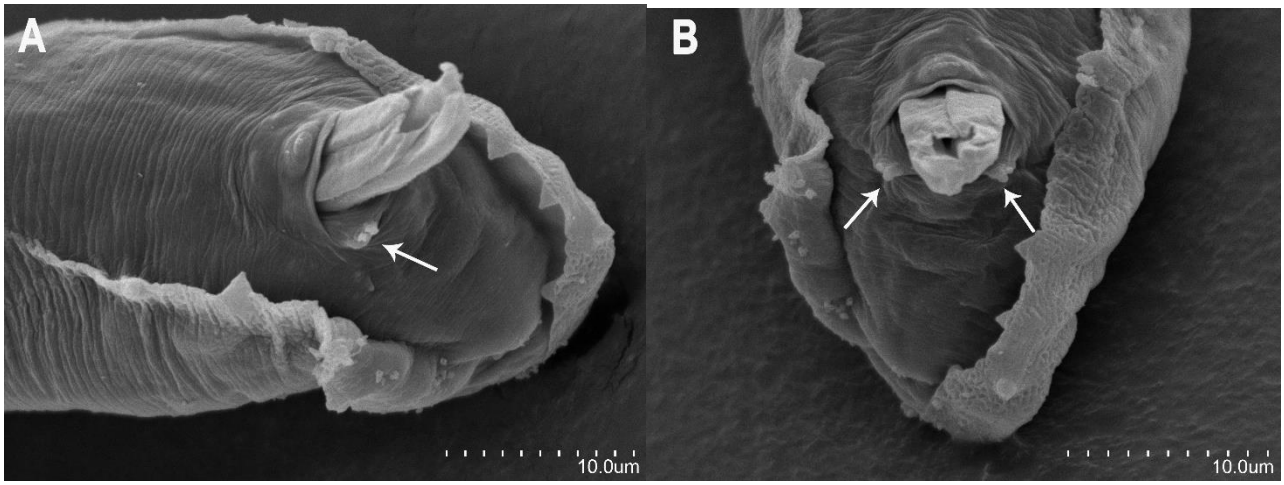

Figura 14. Micrografías SEM de *Metarhabditis rainai* de macho. A, región posterior, vista lateral, papilas bursales con pequeñas papilas bifurcadas, B, vista ventral que muestra dos pares de pequeñas papilas en el borde posterior de la cloaca y las espículas (Micrografías realizadas en el SEM del instituto de Biología, UNAM).

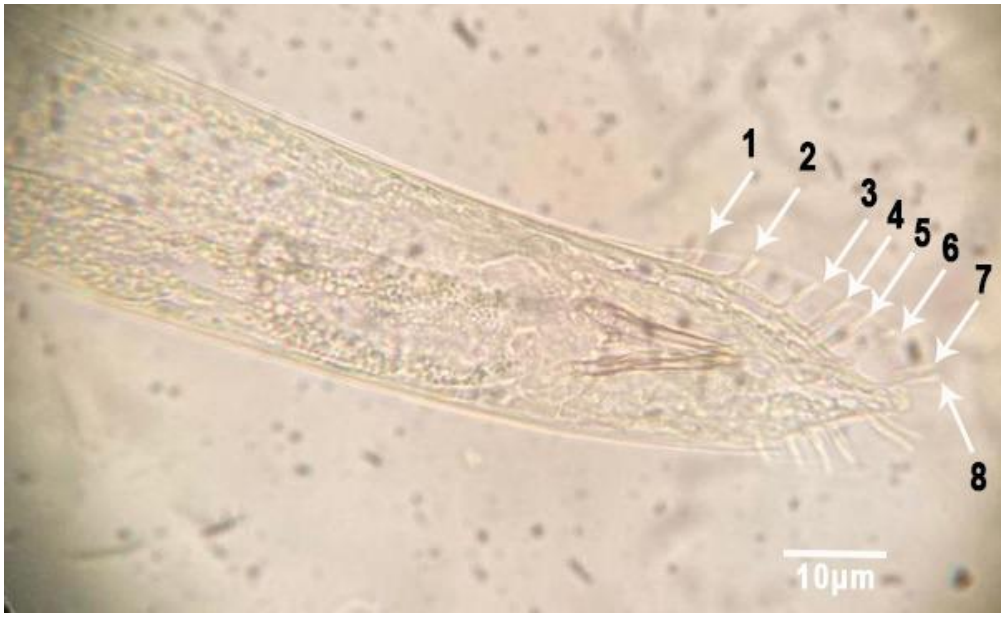

Figura 15. Micrografía de luz clara. Vista ventral del ejemplar macho de *Metarhabditis rainai* que muestra ocho papilas bursales.

Análisis filogenético de *Metarhabditis rainai:*

Se obtuvieron cinco secuencias del gen 28S de machos de *M. rainai* previamente fotografiados y medidos, las cuales tuvieron una longitud de 850 a 854 pb. La matriz alineada tuvo una longitud de 954 pb y contó con representantes de 23 especies de diferentes géneros de Rhabditidae (Figura 16). El modelo de evolución estimado fue el GTR+GAMMA+I. El valor del árbol fue ln= −6334.028607. Nuestros especímenes estuvieron todos anidados en el mismo clado con otros especímenes de *M. rainai* previamente secuenciados y disponibles en el Genbank, donde también se agruparon como especies hermanas del clado formado por *M. blumi* + *M. amsactae* (Figura 16). Las distancias genéticas intraespecíficas entre los ejemplares de Tikuch y los de *M. rainai* del GenBank fueron nulas, mientras que con respecto a *M. blumi* y *M. amsactae* fue de 19.33 y 18.27%, respectivamente. Desafortunadamente, no fue posible secuenciar con éxito el gen ribosómico ITS para *M. rainai*.

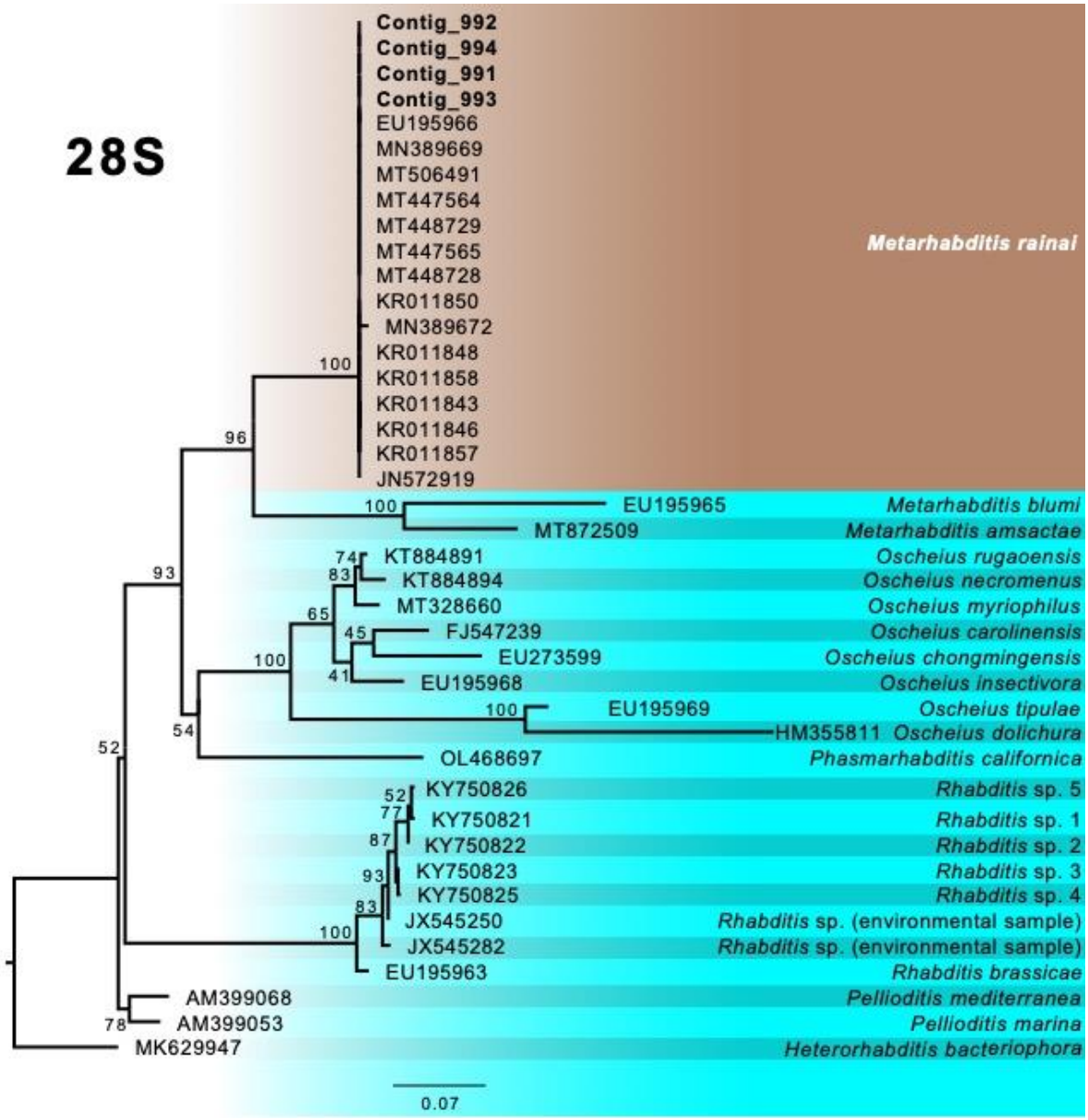

Figura 16. Relaciones filogenéticas de especies del género *Metarhabditis* y otras especies de la Familia Rhabditidae utilizando el método de máxima verosimilitud para generar los árboles filogenéticos.

Identificación molecular y análisis filogenético de *Heterorhabditis indica*

La comparación de las secuencias de nucleótidos con las secuencias publicadas en GenBank a través de BLAST nos permitió identificar molecularmente otro de nuestros nemátodos aislados, donde algunos de los ejemplares tuvieron un alto porcentaje de similitud con *H. indica* (99.73-100% en ITS y 99.89-100 % en 28S). Con respecto al análisis filogenético, el conjunto de datos ITS final constó de 57 secuencias que representaban 17 especies, y la alineación tuvo una longitud de 1092 pb. El modelo de sustitución seleccionado para este conjunto de datos fue GTR+I. Las frecuencias de nucleótidos fueron A=0,254, C=0,203, G= 0,255 y T=0,288. El valor de ML del árbol fue -ln= 4451.710121. El árbol filogenético obtenido con el conjunto de datos ITS mostró que las nuevas secuencias de este estudio se agruparon al clado correspondiente a *H. indica* (Figura 17). Todas las secuencias identificadas como *H. indica* se agruparon con otros especímenes secuenciados de *H. indica*, en un clado que también contenía a *H. noenieputensis* (Figura 17). La distancia genética entre *H. indica* y *H. noenieputensis* fue de 1 a 1,2% (7 a 9 nucleótidos). La distancia genética intraespecífica de *H. indica* fue de 0 hasta 0,4%. Para el gen 28S, el conjunto de datos constó de 45 secuencias que representaron 16 especies, con una longitud de 934 pb. El modelo de sustitución seleccionado fue GTR+G+I. Las frecuencias de nucleótidos fueron A=0,260, C=0,193, G=0,295 y T=0,252. El valor de ML del árbol fue -ln= 2146,711150. Las relaciones filogenéticas de *H. indica* con el gen 28S fueron prácticamente las mismas que las obtenidas con el ITS. Los nemátodos de Cansahcab, Dzan y Sucila se agruparon como *H. indica*, con una distancia genética interespecífica de 0,3% (3 nucleótidos) con *H. noenieputensis*. La distancia genética intraespecífica de *H. indica* fue de hasta 0,2% (2 nucleótidos).

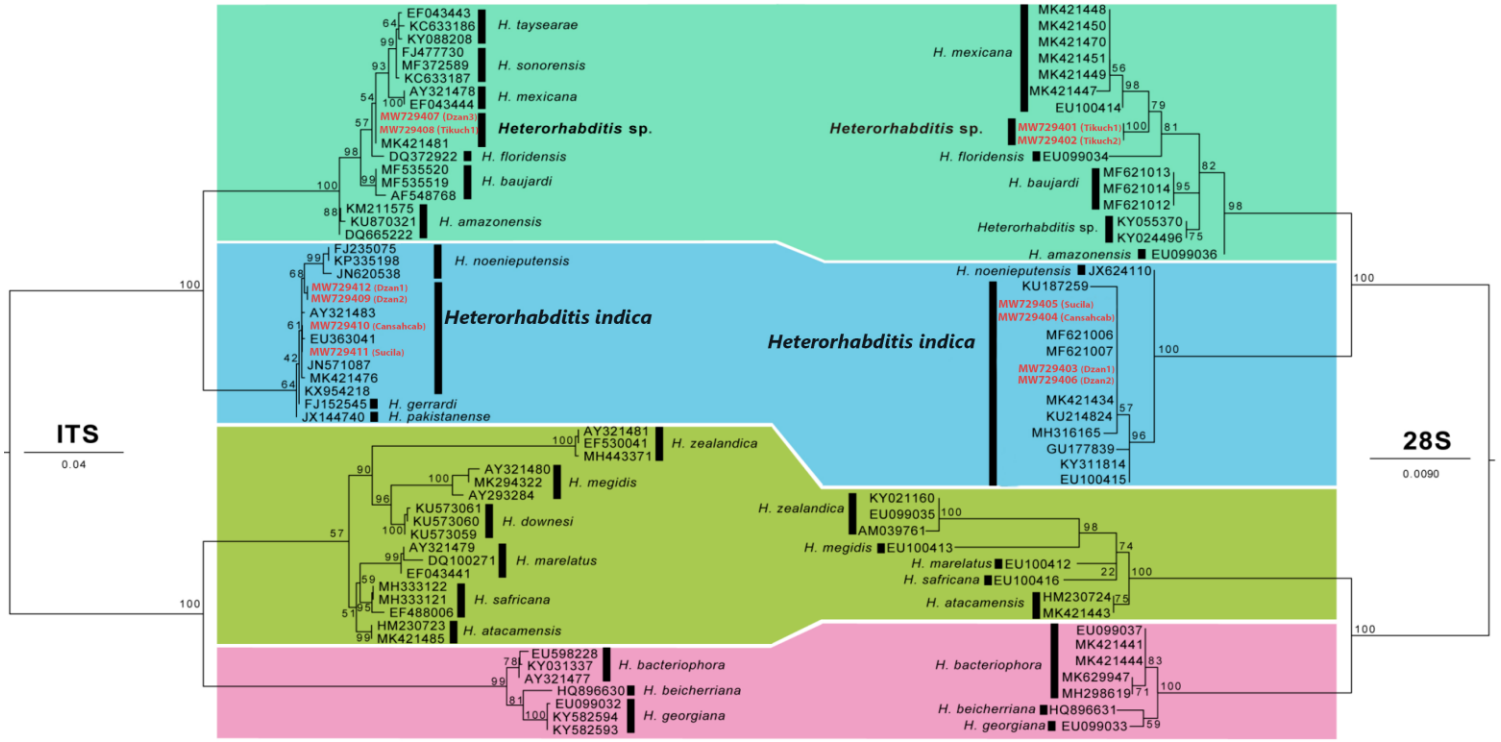

Figura 17. Relaciones filogenéticas de especies del género *Heterorhabditis* utilizando el método de máxima verosimilitud para generar los árboles filogenéticos. En el lado izquierdo se muestra el árbol obtenido con ITS y en el lado derecho el árbol resultante con 28S. Las secuencias recién generadas están resaltadas en rojo. Los números cerca de los nodos del árbol representan los valores de soporte de arranque y la barra de escala indica el número de sustituciones por sitio.

Discusión

Heterorhabditis n. sp., *Metarhabditis rainai* y *Heterorhabditis indica* son reportados por primera vez en el estado de Yucatán, México. Los hallazgos de estas especies de nemátodos fueron corroborados principalmente por identificación molecular y análisis filogenético. En el caso de *Heterorhabditis* n. sp, no se pudieron colectar ejemplares machos, por lo que la descripción taxonómica se basó en hermafroditas, hembras anfimicticas y juveniles infectivos se basó en el análisis molecular. En el caso de *M. rainai*, solo fue posible aislar los ejemplares machos de los cuales se reportaron sus caracteres morfológicos más importantes. Y en el caso de *H. indica* no se incluyó una descripción taxonómica porque es una especie muy reportada y ampliamente conocida, por lo que solo fue necesaria su corroboración molecular y filogenética. Los resultados sugieren que hay características particulares en el suelo de Yucatán, tales como las concentraciones de K, Ca y pH que pudieran estar permitiendo la presencia de estos nemátodos.

Muestras de suelo

El tipo de suelo (arena, limo, arcilla) no pareció ser tan importante como la composición fisicoquímica del suelo para la presencia de NEPs. Los nemátodos estuvieron presentes en suelos con pH alcalino entre 7,2 y 8. Se ha comprobado que los niveles alcalinos (10) o ácidos (5,6) reducen la supervivencia de NEPs, en comparación con valores más cercanos a la neutralidad (Plante et al., 2006). Este resultado coincide con lo informado por Rodríguez et al. (2009) donde se observó que *Heterorhabditis* estuvo presente en suelos con un pH alcalino en comparación con *Steinernema.*

La concentración de potasio reportada en muestras de suelo en este estudio fue de 0.03 a 14.70 (Cmol(+)/kg) y de 17.00 a 80.20 (Cmol(+)/kg) de calcio. Alumai et al., (2006) mencionaron no encontrar correlación entre la presencia de NEPs y factores como calcio, potasio y pH en el césped, pero que en conjunto contribuyen a la capacidad de intercambio catiónico del suelo. Así, aparentemente K y Ca podrían ser los factores que influyeron en la presencia y distribución de estos NEPs en suelo

del Estado de Yucatán. A pesar de que no se encontraron diferencias significativas entre tipos de suelo, los NEPs se encontraron más en suelos donde se realiza agricultura.

En general, se ha reportado mayor incidencia de steinernematidos en cultivos forrajeros y cultivos industriales, en comparación con heterorhabditidos que se encuentran principalmente en cultivos forrajeros y árboles frutales. Esto podría estar relacionado con la diversidad y la densidad de las poblaciones de insectos asociadas con plantas cultivadas en tierras agrícolas (Helmberger et al., 2017).

En este trabajo se clasifico el tipo de suelo en el que se encontraron NEPs, como suelos arenoso-arcillosos. Dolinski et al. (2008) sugieren que *H. indica*, junto con otros NEPs típicos de regiones tropicales, se pueden encontrar en ambientes con un porcentaje relativamente alto de arena. Yooyangket et al. (2018) reportaron 13 aislamientos de *Heterorhabditis* y 14 aislamientos de *Steinernema* en suelos arcillosos del Parque Nacional Nam Nao, Tailandia. Por lo tanto, la diferencia entre los suelos de Yucatán y Tailandia estaría en los contenidos de arena. Si este contenido de arena está actuando o no como un factor limitante para la supervivencia de NEPs de Yucatán, debe probarse experimentalmente. De la misma manera, es importante extender esta investigación a nuevos puntos de muestreo en el estado de Yucatán probablemente sin la influencia de la agricultura para determinar si la baja riqueza de especies de NEPs detectada es un patrón regional. Esto es importante porque otros autores han señalado que los factores edáficos pueden influir dramáticamente en la presencia de estos organismos (Lacey y Kaya, 2000).

Identificación morfológica, molecular y análisis filogenético de *H. indica* y *Heterorhabditis* n. sp.

El análisis de las secuencias de nucleótidos, el análisis filogenético del 28S e ITS y y la morfología de los nemátodos aislados de Dzan, Cansahcab y Sucila en este estudio nos permitió corroborar la identificación taxonómica de dos especies de *Heterorhabditis*.

En el caso de la especie que denominamos *Heterorhabditis* n. sp., las características morfológicas ya habían sido descritas previamente por Ávila-López, (2016). Sin embargo, la descripción se quedó a nivel de género. En este trabajo se complementó dicha descripción con herramientas moleculares, su análisis filogenético y las distancias genéticas, que corroboran que este nemátodo si es una especie genéticamente diferente a las secuenciadas y descritas previamente. El caso de *H. indica* en el estado de Yucatán no sorprende, ya que aparentemente es una especie distribuida a nivel mundial (e.g. Saleh et al., 2001; Dolinski et al, 2008; Bruno et al, 2020) y por lo tanto bien caracterizada tanto por taxonomía clásica (morfología y morfometría) como molecular. El análisis filogenético posicionó a *H. indica* del estado de Yucatán dentro del grupo Indica, nombrado por Andaló, Nguyen y Moino, 2006 (Nguyen, Shapiro-Ilan y Mbata, 2008; Malan et al., 2014; Dhakal et al. 2020). Todas las especies del grupo Indica se encuentran en zonas tropicales y subtropicales y este grupo se divide en dos subclados: el subclado Indica conformado por *H. indica* y *H. noenieputensis*, y el subclado Baujardi con *H. baujardi*, *H. amazonensis*, *H. floridensis*, *H. mexicana* y *H. taysearae* (Dhakal et al., 2020). En particular, las dos especies de NEP de nuestro estudio se asociaron filogenéticamente con cada uno de los subclados descritos anteriormente. *Heterorabditis* n. sp. de Dzan y Tikuch se agrupó en el subclado Baujardi, y no hubo diferencias intraespecíficas entre los especímenes secuenciados con ambos marcadores. La posición filogenética de *Heterorhabditis* n. sp. tiene sentido geográficamente, porque se agrupó con especies que han sido descritas en América del Norte, como *H. mexicana* y *H. floridensis* (Nguyen et al., 2004; Nguyen, Mrek y Webster, 2006).

Competencia entre nemátodos entomopatógenos y nemátodos bacteriófagos de vida libre

La infección mixta entre *Heterorhabditis* n. sp. y *Metarhabditis rainai* en larvas de *G. mellonella* se registra por primera vez. Este hallazgo revela una fuerte competencia intragremial entre estas dos especies de nemátodos, ya que una especie interviene

en el desarrollo y ciclo de vida de la otra. Esto se traduce en la ausencia de ejemplares machos de *Heterorhabditis* en los cadáveres. Este hecho posiblemente se debió a la fase de recuperación de los NEPs ya que, al no encontrarse las condiciones nutricionales adecuadas, indujeron la fase de juveniles infectivos para buscar otros hospederos. Por el contrario, cuando hay altas concentraciones de alimento, se induce la generación de machos y hembras (Figura 18) (Strauch y Ehlers 1998).

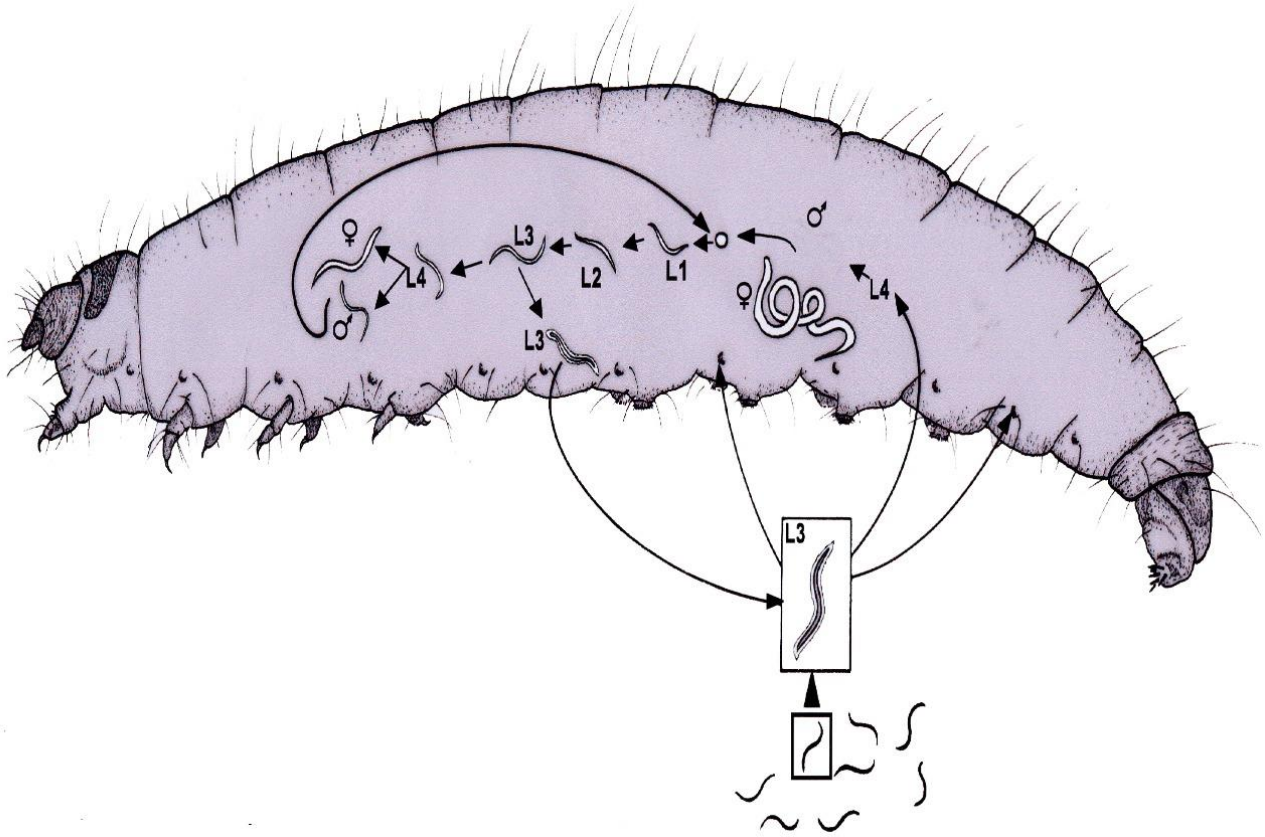

Figura 18. Ciclo de vida del nemátodos del género *Heterorhabditis* dentro de larva *G. mellonella.* La imagen explica paso a paso los cambios de estadio del nemátodo desde la entrada al hospedero, haciendo énfasis en el estadio L3, ya que, si hay suficientes recursos dentro del hospedero, el nemátodo continua con su ciclo. De lo contrario, entra a la fase de recuperación donde detiene su desarrollo en L3 para salir en busca de otro hospedero.

Por otro lado, sería necesario cuantificar los nemátodos de ambos grupos, ya que se desconoce en qué medida los ejemplares de *M. rainai* desplazan a la descendencia de NEPs, dado que solo se encontraron ejemplares machos de los nemátodos bacteriófagos de vida libre (NBVL) al disectar el cadáver de larvas de *G. mellonella*. Campos-Herrera et al. (2012), describieron un conjunto de sondas que permitieron la cuantificación de NBVL en combinación con NEPs. Los autores realizaron infecciones mixtas de *Acrobeloides maximum* (cepa RT-1-R15C y RT-2-R25A) y *Metarhabditis rainai* (PT-R14B) con *Steinernema diaprepesi*, *Steinernema riobrave* y *Heterorhabditis* en larvas de gorgojo *Diaprepes abbreviatus*. Entre los resultados se encontró que ambas cepas de *A. maximum* se reprodujeron 25.64% más que *M. rainai* dentro de los cadáveres. En cambio, la reproducción de *S. riobrave* disminuyó al combinarse con *A. maximum* ($p = 0.01$).

Del mismo modo, Duncan et al. (2003) determinaron hasta qué punto los NBVL lograron desplazar a NEPs dentro del hospedero. Estos autores reportaron alteraciones en la reproducción de *S. riobrave* al combinarse con *Pellioditis* sp., ya que se observó una disminución del 84% en los juveniles infectivos que emergieron de las canales de *D. abbreviatus*.

En el caso de *Heterorhabditis*, el juvenil infectivo que logra ingresar al huésped se convierte en hermafrodita, pone huevos que eclosionan dentro del útero y da lugar a la primera generación de juveniles. Los juveniles se desarrollan y se alimentan del hermafrodita hasta agotar los tejidos. Después de que el hermafrodita ha muerto, emergen los juveniles infectivos. Estos juveniles infectivos se convierten en una generación anfimíctica de machos y hembras o se interrumpen en la etapa juvenil infectiva (proceso llamado recuperación). Este proceso dependerá de la concentración de las señales alimentarias en los hospederos.

Por ejemplo, Strauch et al. (1994) inocularon juveniles infectivos de *Heterorhabditis* spp. en medios de cultivo líquidos. Los juveniles de primera etapa se inocularon directamente en cultivos que contenían *Photorhabdus luminescens*, en comparación con los juveniles infectivos que se mantuvieron en ayunas durante 24 horas. Los autores informaron que, en condiciones nutricionales favorables (en presencia de *P. luminescens*), los nemátodos se convirtieron en un 30 % en

hembras anfimícticas, un 38 % en machos y un 32 % en hermafroditas. En cambio, los nemátodos en ayunas obtuvieron una producción de 53.30% de juveniles infectivos, 40% de hermafroditas y 6.60% de adultos anfimícticos. Se concluyó que las condiciones de cultivo (en este caso la presencia o ausencia del simbionte bacteriano) definieron la reproducción automíctica o anfimíctica de los nemátodos del género *Heterorhabditis*.

Todos estos hallazgos nos llevaron a preguntarnos si todas las especies de NEPs podrían ser susceptibles a la infección mixta con NBVL, dado que la estrategia que utilizan, es decir, pausar su desarrollo para buscar otros hospederos, puede influir en la persistencia y eficacia de la cepa de NEP utilizada en el control biológico de insectos plaga.

Conclusiones

Debido a que las secuencias de ADN fueron más efectivas que la morfología para diferenciar organismos, recomendamos que su uso para diagnosticar especies sea cada vez más recurrente, pero con la inclusión de análisis filogenéticos robustos y no solo métodos de distancia genética como el código de barras. Este estudio pone a disposición información morfológica y secuencias de ADN de la región ribosómica que sirven como carácter diagnóstico de la nueva especie.

En resumen, se encontró una fuerte competencia intragremial entre una nueva especie de nemátodo nativo *Heterorhabditis* n. sp. y *M. rainai*. En este trabajo clasificamos a *M. rainai* como un cleptoparásito por sustraer los recursos de un cadáver parasitado por un NEPs. Además, *Heterorhabditis* n. sp. fue desplazado fuera del cadáver al tener que pausar su desarrollo para salir en busca de otro hospedero por falta de alimento.

Por otro lado, se sugiere realizar pruebas de laboratorio entre diferentes especies de NEPs contra *M. rainai* para determinar qué especie es más capaz de competir contra NBVL y así seleccionar la cepa de NEP con mayor eficiencia en el control biológico de insectos plaga.

CAPITULO III. CAPACIDAD INFECTIVA DE NEMÁTODOS ENTOMOPATÓGENOS AISLADOS EN YUCATÁN CONTRA LARVAS DE MOSQUITO.

INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años, varios estudios se han centrado en el aislamiento de NEPs nativos como herramientas de control biológico para combatir mosquitos que pueden transmitir enfermedades humanas importantes, como el Dengue, Zika, Chikungunya y la fiebre amarilla (Kovendan et al., 2018). Recientemente, Dilipkumar et al. (2019) aislaron *Steinernema siamkayai, Heterorhabditis indica, Steinernema glaseri* y *Steinernema abbasi* y evaluaron su potencial de biocontrol contra larvas de *Ae. aegypti*, *Anopheles stephensi* y *Culex quinquefasciatus*. De la misma forma, en Tailandia, Yooyangket et al. (2018) evaluaron la actividad larvicida de bacterias simbióticas pertenecientes a NEP contra *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*. En México existen muy pocos reportes de NEPs nativos. Por ejemplo, Girón et al. (2012) aislaron *Heterorhabditis mexicana*, *Steinernema carpocapsae* y *Steinernema feltiae* de suelos de Oaxaca. En Sonora, Stock, Rivera-Orduño y Flores-Lara, (2009) aislaron *Heterorhabditis sonorensis* (actualmente, *Heterorhabditis taysearae*; Dhakal et al., 2020) en cadáveres de ninfas de *Diceroprocta ornea* (Homoptera: Cicadidiae) en cultivos de espárrago. La mayoría de los NEPs aislados en México han sido probadas para el control biológico de plagas de importancia agrícola (Stock, Rivera-Orduño y Flores-Lara 2009; Salgado-Morales et al., 2019).

México también tiene un problema muy importante con la capacidad insidiosa de *Ae. aegypti* por transmitir enfermedades virales como el dengue, con 268.458 casos en 2019 (https://www.paho.org/data/index.php/es/mnu-topics/indicadores-dengue-es/dengue-nacional-es/ 252-dengue-pais-ano-en.html?). Las acciones oficiales para el control de la propagación del vector han sido la eliminación de criaderos y el uso de plaguicidas organofosforados y organoclorados.

Sin embargo, un inconveniente importante de estos compuestos es que provocan alteraciones en el sistema nervioso, inmunológico, respiratorio, endocrino y

reproductivo de los humanos, además de resistencia y persistencia relacionadas con el medio ambiente (Blair et al., 2014). En zonas rurales y urbanas, el uso de dichos plaguicidas representa la principal causa de contaminación de las aguas subterráneas (Olvera et al., 2008). Polanco et al. (2015) informaron sobre la presencia de plaguicidas organoclorados como el DDT en una concentración de 16 ppb en el acuífero del estado de Yucatán, Anillo de Cenotes. Por ello, es de suma importancia buscar otras alternativas ambientalmente amigables para el control del ciclo de vida del vector *Ae. aegypti* y una de estas alternativas son los NEPs.

Hipotesis

Dado que los NEPs son patógenos para los insectos, la especie más frecuente y abundante aislada en suelos del estado de Yucatán, debería ser capaz de producir una alta mortalidad (> 70%) en larvas de mosquito *Ae. aegypti.*

Objetivo general

Determinar la capacidad infectiva de *H. indica* (cepa aislada en el estado de Yucatán) contra larvas de *Ae. aegypti.*

MATERIALES Y MÉTODOS

INFECCION EXPERIMENTAL

Para los ensayos, utilizamos *H. indica* especie de NEP más frecuente y abundante recuperada de las infecciones por *G. mellonella* de muestras de suelo de Dzan. Se utilizaron matraces de 1,9 litros de capacidad con 400 ml de agua corriente burbujeada. Se determinaron cuatro concentraciones de nemátodos: 1:1.260 larvas de mosquito/juveniles infectivos [l/[JIs]), 1: 2.520 l/JIs, 1: 3.780 l/JIs, 1: 5.040 l/JIs y un testigo por concentración (larvas de mosquito sin nemátodos) con cada concentración replicada cuatro veces. Cada matraz de tratamiento y control contenía diez larvas de *Ae. aegypti* del tercer estadio. La infección experimental se replicó dos veces, con resultados muy similares. Los huevecillos de *Ae. aegypti* fueron eclosionados (Figura 19) y criados en el Laboratorio de Patología Acuática del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (unidad Mérida) con huevos gentilmente donados por el Centro de Investigación Dr. Hideyo Noguchi y el laboratorio de Bioinsecticidas del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato. Las mortalidades de las larvas de mosquito se monitorearon cada 4 horas hasta las 48 horas posteriores a la exposición (tiempo permitido antes de la transformación de las larvas en pupas). Las larvas de mosquito muertas (aquellas que no se mueven cuando se tocan con un pincel fino) se lavaron (tres veces) con agua destilada y se fijaron en DNA/RNA Shield.

La supervivencia de *Ae. aegypti* se estimó a través de un análisis de supervivencia (estimación de Kaplan-Meier). Este análisis es un método estadístico no paramétrico para estimar la probabilidad de supervivencia de las larvas de mosquito después de la infección con *H. indica* a lo largo del tiempo. Para determinar la dosis a la que *H. indica* causó el 50% de la mortalidad en *Ae. aegypti*, se realizó un análisis probit siguiendo el procedimiento de Finney (1971). El software utilizado para el

análisis probit y de supervivencia fue MedCalc® (MedCalc Software Ltd, Ostende, Bélgica).

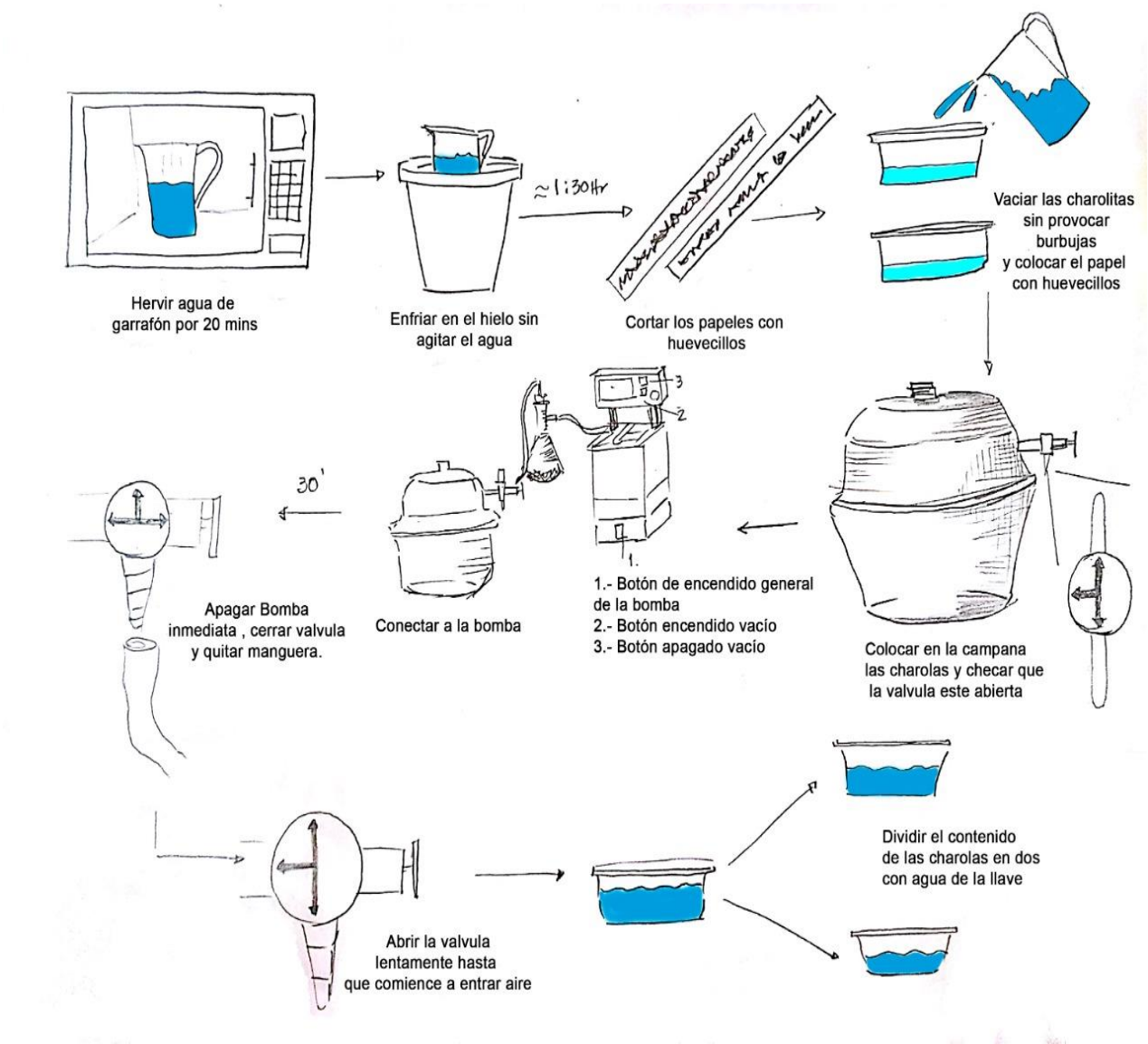

FIGURA 19. Metodología para la eclosión inducida de huevecillos de *Ae. Aegypti* mediante una bomba al vacío (Metodología estandarizada en el laboratorio de Bioinsecticidas del CINVESTAV, unidad Irapuato).

RESULTADOS

Infección experimental

El porcentaje de los valores de supervivencia de las larvas de *Aedes* expuestas a *H. indica* se muestran en la Figura 20. Los valores medios de supervivencia de las larvas de mosquito expuestas a *H. indica* y sus intervalos de confianza del 95% se muestran en la Tabla 12. Hubo una diferencia significativa en la supervivencia al comparar el promedio de mortalidad de *Ae. aegypti* entre las diversas concentraciones de nemátodos y el control (estimación de Kaplan-Meier, valor P = 0.02). La Figura 20 muestra que la mayor mortalidad (80%) en *Ae. aegypti* se logró usando 1:2,520 l/JIs y 1:3780 l/JIs después de 46 horas. La menor mortalidad obtenida fue del 24% para la concentración con mayor número de nemátodos (1:5.040 l/JI). La dosis letal (LD50) se estimó a diferentes tiempos de exposición (Tabla 13). La LD50 de *H. indica* a las 24 horas fue de 7,040 juveniles infectivos, con un intervalo de confianza del 95 % de 5,802 a 8,277 juveniles infectivos.

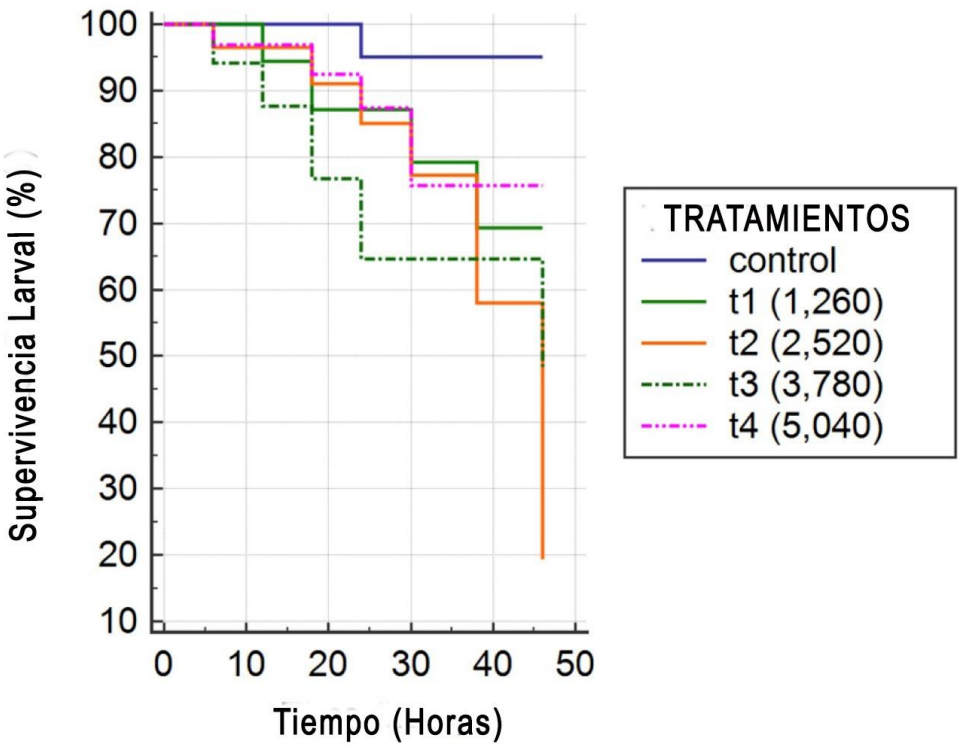

Figura 20. Curvas de supervivencia general de Kaplan-Meier que comparan la mortalidad de larvas de *Aedes aegypti* después de la exposición a juveniles infectivos de *Heterorhabditis indica*. El control no contenía nemátodos. Las unidades de tratamiento fueron el número de juveniles infectivos de *H. indica* por larva de mosquito. Cada tratamiento tenía 10 larvas de mosquito.

Tabla 12. Valores porcentuales de supervivencia de larvas de mosquito *Aedes aegypti* expuestas a nemátodos entomopatógenos *Heterorhabditis indica*. Las siglas fueron las siguientes: SE = error estándar; Intervalos de confianza (IC) del 95 % para el control y los tratamientos (T1-T4); l/[JIs = larvas de mosquitos/juveniles infectivos.

Factor	Supervivencia %	SE	Intervalo de confianza al 95%
Control (sin nemátodos)	81.90	1.07	77.79 – 83.00
T1 (1:1,260 l/JIs)	68.11	2.75	66.31 – 71.42
T2 (1: 2,520 l/JIs)	20.95	2.64	19.72 – 22.16
T3(1: 3,780 l/JIs)	47.51	2.81	45.89 – 52.22
T4 (1: 5,040 l/JIs)	75.58	2.19	72.31 – 79.37

Tabla 13. Dosis letal media (DL50) de *H. indica* contra larvas de mosquitos en tercer estadio a diferentes tiempos de exposición.

Tiempo de exposición (hr)	DL50 (JIs/larva de mosquito)	95% limites de confianza
12	14,997	11,545-19,481
24	7,040	5,802-8,277
48	6,324	5,189-7,458

DISCUSION

Nuestra hipótesis original de que *H. indica* sería capaz de producir un alto porcentaje de mortalidad (> 70%) en larvas de mosquito fue aceptada. Con esto se confirma que *H. indica*, en asociación con su composición bacteriana, fue capaz de inducir una mortalidad del 80% en larvas de *Ae. aegypti* a la concentración de 2.520 JIs/l a las 48 horas después de la infección. Este es el primer registro de NEPs que produce mortalidad en mosquitos *Ae. aegypti* presente en suelo del estado de Yucatán, y los resultados obtenidos fueron promisorios en cuanto a la patogenicidad de este nemátodo y su potencial como alternativa de control biológico.

Por otro lado, es posible que el comportamiento de las larvas de mosquito pueda favorecer la infección. Kinney et al. (2014) describieron con precisión el comportamiento de las larvas de *A. aegypti* basándose en 3 elementos: 1) retorcimiento, 2) filtración estacionaria en donde se alimenta en la superficie del recipiente de agua y 3) ramoneo del sustrato. Como era de esperarse en los contenedores donde se realizaron los bioensayos, la búsqueda de sustrato aumenta activamente después de detectar el fondo del contenedor con escasez de alimentos. Por lo tanto, podría pensarse que el comportamiento de alimentación de las larvas de mosquito aumenta la posibilidad de infección por el nemátodo. La explicación anterior concuerda con Glauger (1994), quien señaló que la biología del nemátodo

entomopatógeno y su huésped deben coincidir para provocar con éxito una infección.

Los nemátodos entomopatógenos se han enfrentado principalmente a los insectos que habitan en el suelo y pueden persistir durante 2 o 3 semanas (Belien, 2018).

Sin embargo, Edmunds et al. (2017) sugirió que *S. feltiae, S. carpocapsae, S. kraussei* y *H. bacteriophora* son capaces de matar a mosquitos *Chironomus plumosus* en su estadio larval que es acuático con menos del 20% de supervivencia después de cuatro días.

Además, los NEPs pueden aguantar en el agua a una profundidad de 30 cm hasta 96 horas. Varios estudios demuestran que los NEPs tienen longevidad en el agua y aún conservan su capacidad de infectar. Por ejemplo, el juvenil infectivo de *S. abbasi* y *H. indica* tuvo 85,76% y 88,09% de supervivencia 30 °C después de 15 días de exposición (Sunanda et al., 2012). Del mismo modo, *H. indica* puede almacenarse en agua destilada entre 8 y 30 °C durante 42 días, mientras que *Steinernema bicornutum* se almacena mejor a 8 °C, y su virulencia contra *G. mellonella* no se ve afectada (Hussaini et al., 2000). Después de 90 días de incubación bajo condiciones controladas de laboratorio, *H. indica* mostró una tasa de supervivencia del 77,29 % a temperatura ambiente (25–28 °C). De hecho, reportes previos sugieren que los estadios larvales infectivos de nemátodos entomopatógenos terrestres pueden infectar larvas de mosquitos en ambientes acuáticos, como es el caso de *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis indica* infectando las larvas de *Culex quinquefasciatus* y *Culex pipiens*, respectivamente (Poinar y Kaul, 1982; Zohdy et al., 2013).

El siguiente paso de esta investigación es el someter a los nemátodos a exposición de campo para un control biológico preciso de las larvas de mosquito *A. aegypti*, especialmente en cementerios locales en criptas con floreros sombreadas ubicadas en cementerios de Yucatán, ya que estos lugares representan hábitats adecuados para las larvas de mosquito. Es importante señalar que, aun cuando los floreros no tienen flores, estos se llenan de agua diariamente durante la época de lluvias, saturándose con diferentes especies de larvas de mosquitos. La situación antes mencionada sobre los floreros en cementerios se ha confirmado en la Ciudad de

México (Díaz-Badillo et al., 2011), Campeche (Sosa-Cabrera, 2008), Argentina (Vezzani et al., 2007), Estados Unidos (Dhillon y Mulla, 1980) entre otros lugares en el mundo.

CONCLUSION

El trabajo actual demuestra que las larvas de *A. aegypti* pueden infectarse con *H. indica* en condiciones climáticas tropicales. También sugiere que la explicación más viable para la tasa de mortalidad relativamente alta fue la septicemia producida por el simbionte bacteriano. Sin embargo, resulta difícil desarrollar un método alternativo que pueda conectar nemátodos vivos con larvas de mosquitos en el campo y que sea económicamente viable. Por lo tanto, el siguiente objetivo debe centrarse en los metabolitos secundarios con actividad insecticida producidos por *Photorhabdus* u otro complejo local de nemátodos/bacterias que podrían matar las larvas de mosquitos. Los agentes no nativos que pueden actuar como control biológico (nemátodos, bacterias o sus metabolitos) deben ser tan específicos como sea posible para disminuir los daños potenciales que pueden causar a los insectos útiles, como las especies locales de abejas u otros polinizadores.

CAPITULO IV. COMPOSICIÓN BACTERIANA DE LARVAS *Aedes aegypti* POST-INFECCION CON NEPs

INTRODUCCIÓN

Las nuevas tecnologías de secuenciación ofrecen herramientas para comprender las estructuras y dinámicas de las comunidades microbianas. Los enfoques de perfiles comunitarios basados en secuencias se han aplicado a las comunidades microbianas que se pueden encontrar en suelos, agua dulce, agua salada, invertebrados etc. Los cadáveres de insectos han recibido menos atención que los cadáveres de vertebrados, pero también pueden albergar comunidades microbianas dinámicas formadas por la competencia interespecífica por los nutrientes (Wollenberg, 2016). Sin embargo, irónicamente, uno de los sistemas modelo de cadáveres de insectos mejor estudiados se destacó inicialmente por su aparente falta de una comunidad microbiana diversa. Las larvas de insectos muertas por dos géneros de nemátodos entomopatógenos son notables porque no se pudren (Clarke, 2014). La no putrefacción se debe a un simbionte bacteriano transportado dentro de los nemátodos: *Xenorhabdus* spp. en *Steinernema* y *Photorhabdus* spp. en *Heterorhabditis*. Estas bacterias simbiontes son liberadas por el nemátodo al entrar en una larva de insecto viva y contribuyen a la muerte del insecto y a la reproducción del nemátodo (Clarke, 2014). También producen antibióticos y otras moléculas que inhiben los organismos competidores (Challinor, 2015).

Las relaciones monoxénicas entre *Steinernema-Xenorhabdus* y *Heterorhabditis-Photorhabdus* en cadáveres de insectos se han probado con frecuencia (Eivazian, Mohammadi y Girling, 2017). Sin embargo, estás relaciones están sujetas a un constante debate ya que se ha notado la presencia de bacterias que no son *Photorhabdus* o *Xenorhabdus* dentro de los cadáveres, al menos en niveles bajos. Por ejemplo, se han aislado bacterias como *Providencia* sp., *Ochrobactrum* sp*., Pseudomonas* sp. y *Alcaligenes faecalis* de NEPs, sin una comprensión clara de su papel en dichas interacciones (Jackson et al., 1995; Babic et al., 2000; Gouge y

Snyder, 2006). En insectos, la mayoría de los estudios de microbiota se han basado en la composición bacteriana intestinal o hemolinfa de los insectos infectados (Engel y Moran, 2013). De hecho, se han encontrado asociaciones diaxénicas de bacterias no canónicas como *Pseudomonas aeruginosa* en los JIs de diferentes generaciones de *H. indica*, que favorecen la infección de huéspedes como *Galleria mellonella, Tenebrio molitor, Heliothis subflexa* y *Diatraea magnifactella* cuando se combinan con *Photorhabdus luminescens* (Salgado-Morales et al., 2019). Es por esto necesario determinar cuál es la composición bacteriana en organismos infectados y no infectados con nemátodos entomopatógenos, y cuál es el papel relativo que juegan las bacterias ya reportadas en la literatura (Phtorhabdus y Xenorhabdus), así como las que se encuentran con menor frecuencia en la capacidad infectiva de los nemátodos.

HIPÓTESIS

Existen comunidades bacterianas presentes que ayudan a la muerte del hospedero en la interacción nemátodo entomopatógeno/insecto.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la composición bacteriana presente en la infección de larvas de *Ae. aegypti* expuestas a diferentes concentraciones de nemátodos entomopatógenos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento e identificación molecular de bacterias simbiontes

El aislamiento e identificación de *Photorhabdus* se realizó en el laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de Naresuan, Phitsanulok, Tailandia. Primero los cadáveres de *G. mellonella* se limpiaron sumergiéndolos 3 veces en etanol del 75%, posteriormente se sembró hemolinfa de *G. mellonella* infectada con NEPs en cultivo NBTA (agar nutritivo, azul de bromotimol y cloruro de trifenil-2,3,5-tetrazolio) (Akhurst, 1980). La colonia roja de *Photorhabdus* se aisló después de cuatro días a temperatura ambiente y se inoculó en caldo Luria-Bertani con agitación a 140 rpm durante 24 horas. Posteriormente se realizó la extracción genómica de ADN de bacterias simbiontes con Blood/Cell DNA Mini Kit (Geneaid Biotech Ltd., New Taipei, Taiwán) para la amplificación y secuenciación del gen 16S ARNr como describen Rainey et al (1995) y Szallas et al (1997). Para la mezcla de PCR en cada tubo, agregamos lo siguiente: 3 µl de tampón 10x (1x), 4,2 µl de MgCl2 25 mM (3,5 mM), 0,6 µl de dNTP 10 mM (200 µM), 1,2 µl de cebador directo 5 µM (0,8 µM), 1,2 µl de cebador inverso 5 µM (0,8 µM), 0,3 µl de ADN polimerasa Taq de 2,5 unidades (0,1 U/ml), 3 µl de solución de ADN genómico (20–200 ηg) y 16,5 µl de agua destilada estéril con un total de 30µl de la reacción de PCR.

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador (Applied Biosystems, Pittsburgh, PA, EE. UU.). El ADN se limpió según el PCR clean-up Gel Extraction Kit (Macherey-nagel, Düren, Alemania). La secuenciación del ADN fue analizada por el servicio de Macrogen Inc. en Corea.

Preparación de suspensión de células bacterianas y extracción de metabolitos secundarios.

Las pruebas de células enteras y la extracción de metabolitos secundarios se realizaron en el laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de Naresuan, Phitsanulok, Tailandia. El primer paso fue inocular *Photorhabdus* en medio 5YS (5 % (p/v) de extracto de levadura, 0,5 % (p/v) de NaCl, 0,05 % (p/v) de $NH_4H_2PO_4$, 0,05 % (p/v) de K_2HPO_4 y 0,02 % de (p/v) MgSO4.7H_2O) y se incubo a temperatura ambiente durante 48 h. Luego, el cultivo bacteriano se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 min y el sedimento se suspendió en agua destilada estéril hasta una DO600 de 1 (Metertech SP-880, Taiwán).

La suspensión de bacterias se analizó a una concentración de 2 ml (DO600 = 1,0 = 8x108 células/ml). Se usaron agua destilada y *E. coli* como control. Para el aislamiento de metabolitos secundarios, se cultivó *Photorabdus* en caldo LB con agitación a 140 rpm durante 24 h. Se usó acetato de etilo para extraer el bioactivo crudo a través de un evaporador de vacío tres veces (Buchi, Flawil, Suiza). El metabolito secundario seco se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) para su posterior uso como larvicida de mosquitos (Ahmed, 2012).

Detección de bacterias por secuenciación masiva de 16S ARNr

Se realizó la extracción genómica ADN genómico de larvas de *Ae. aegypti* infectadas por *H. indica* (el NEP más frecuente y abundante aislado) con el kit de extracción de sangre y tejidos DNAeasy (Qiagen, Valencia, CA, EE. UU.). La calidad de la extracción de ADN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa (1%). La amplificación de las regiones V3 y V4 hipervariables del ARNr 16S se realizó utilizando los cebadores y las condiciones sugeridas por Klindworth et al. 2013. Los amplicones se purificaron con perlas AMPure XP y se indexaron con el kit Nextera XT, de acuerdo con el protocolo de preparación de bibliotecas recomendado por el fabricante. Los productos de PCR indexados se purificaron y cuantificaron con un

fluorómetro Qubit® 3.0 utilizando el kit de ensayo Qubit dsDNA HS (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE. UU.). El tamaño del amplicón se verificó mediante electroforesis capilar en QIAxcel Advanced (QIAGEN, EE. UU.). Los amplicones individuales se diluyeron en Tris 10 mM (pH 8,5) y se extrajeron a concentraciones equimolares (4 nM). La secuenciación se realizó en CINVESTAV-Mérida utilizando una plataforma Illumina-Miseq (Illumina, San Diego, CA, EE. UU.), con el kit de reactivos MiSeq V3 (2x300), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para conocer la composición de la comunidad microbiana se procesaron fastq demultiplexados con el pipeline QIIME2 (2019.1) (Caporaso et al., 2010; Bolyen et al., 2018). La corrección de errores y la eliminación de ruido para resolver las variantes de secuencia de amplicón (ASV) de las lecturas de Illumina se realizaron con el complemento DADA2, eliminando las quimeras con el método de "consenso" (Callahan et al., 2016; Cadena et al., 2019). Los ASV representativos se asignaron taxonómicamente con el complemento clasificador de taxonomía de consenso V-SEARCH (Rognes et al., 2016), utilizando la base de datos SILVA (v.132) como referencia (Quast et al., 2012).

RESULTADOS

Identificación molecular de simbionte bacteriano

Las secuencias generadas se alinearon con secuencias disponibles en GenBank pertenecientes a otras especies de *Photorhabdus* (tabla 14) asociada simbióticamente con nemátodos del género *Heterorhabditis.* La primera cepa contra la que fue contrastada esta secuencia fue aislada en la isla de Hainan, China (cepa tipo C8404T).

Tabla 14. Búsqueda BLAST basada en 16S del simbionte bacteriano de *H. indica* recolectado en Dzan.

Maxima identidad a	BLASTN				
	Numero de acceso	Puntaje total	Cobertura	E value	Identidad
Photorhabdus hainanensis	NR_116512.1	1104	99%	0.0	98.66%

Extracción de metabolitos secundarios.

La estandarización de la metodología para la extracción de metabolitos secundarios del simbionte bacteriano de *H. indica* concluyo con éxito. El siguiente paso era la caracterización de dichos metabolitos por HPLC-MS que se iba a realizar en el Cinvestav, Mérida. Sin embargo, por causa de la pandemia Covid-19 no se pudo concluir con este objetivo.

Composición bacteriana de larvas de *G. mellonella* infectadas por NEPs

Los análisis bioinformáticos de las secuencias del gen 16S ARNr indicaron que las larvas de *G. mellonella* infectadas por *H. indica* estaba compuesto por diecinueve variantes de secuencia de amplicón (ASV) correspondientes a 10 familias y 13 géneros (Figura 21). En este grupo, *Enterobacter* fue el género dominante en la muestra (50%). Sin embargo, también se detectaron *Acinetobacter* (20%), *Pseudomonas* (10%), *Bacillus* (5%), *Enterococcus* (3%), *Stenotrophomonas* (2%) *Photorhabdus* (1,9%) y otros géneros menos abundantes (< 1%). También encontramos un 30% de un género sin asignar por mala calidad de muestra.

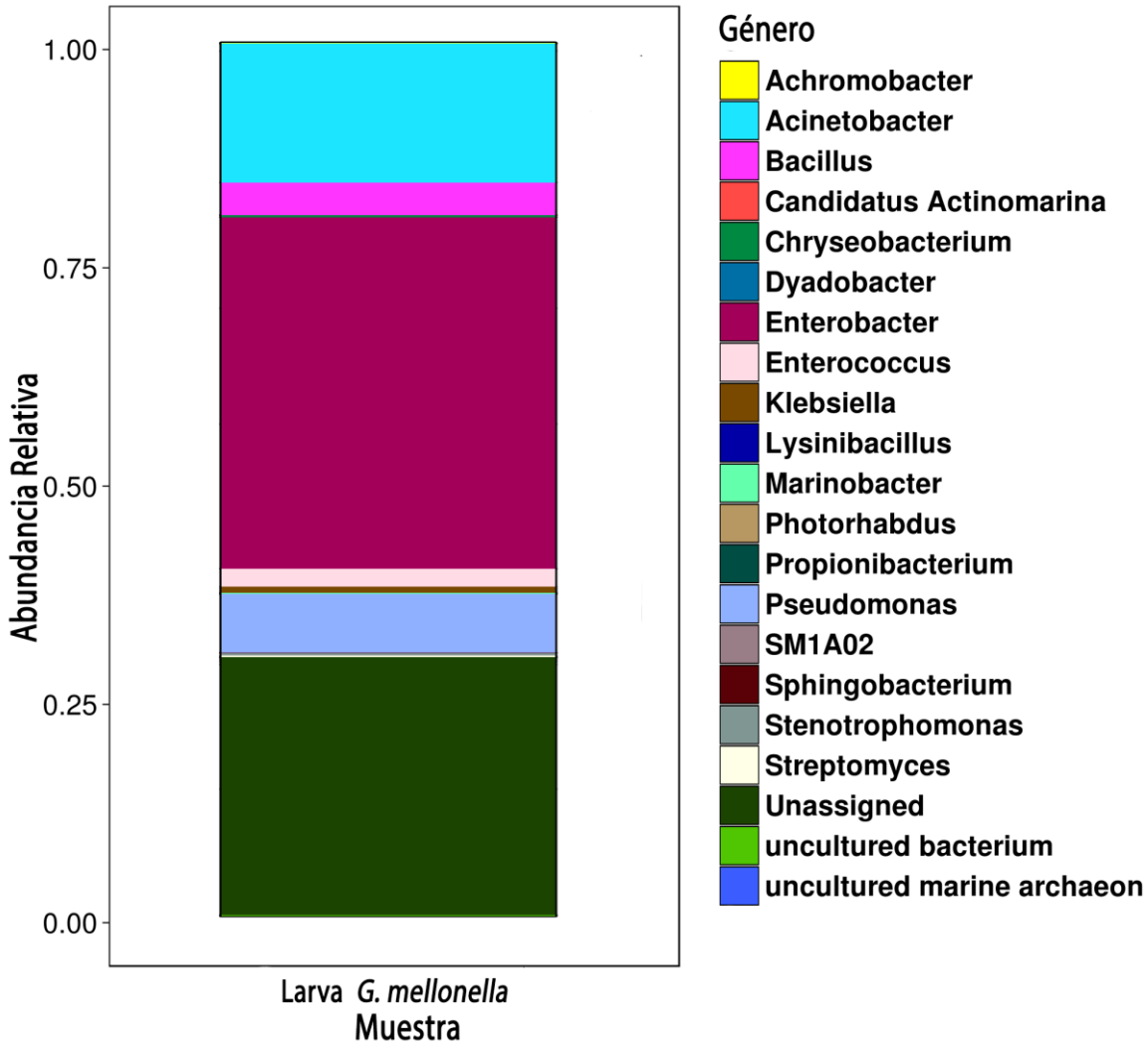

Figura 21. Abundancia relativa de bacterias presentes en las larvas de *G. mellonella* infectadas con *Heterorhabditis indica*. Los colores representan la diversidad bacteriana de los géneros presentes en las larvas.

Composición bacteriana de larvas de *Ae. aegypti* infectadas por NEPs

Los análisis bioinformáticos de las secuencias del gen 16S ARNr indicaron que el grupo de larvas de mosquitos infectados por *H. indica* estaba compuesto por veinte variantes de secuencia de amplicón (ASV) correspondientes a 9 familias y 12 géneros (Figura 21). En este grupo, *Photorhabdus* fue el género dominante en la muestra (74%). Sin embargo, también se detectaron *Elizabethkingia* (10%), *Pseudomonas* (4%), *Delftia* (2%), *Achromobacter* (1.90%) *Phreatobacter* (1.60%) y

otros géneros menos abundantes (< 1%). En contraste, el grupo de larvas de mosquitos no infectados (control) exhibió 19 ASV de 13 familias y 14 géneros (Figura 21). *Delftia* (22%), *Chryseobacterium* (18%), *Brevundimonas* (15%) y *Flavobacterium* (11%) fueron los géneros más abundantes (Figura 21).

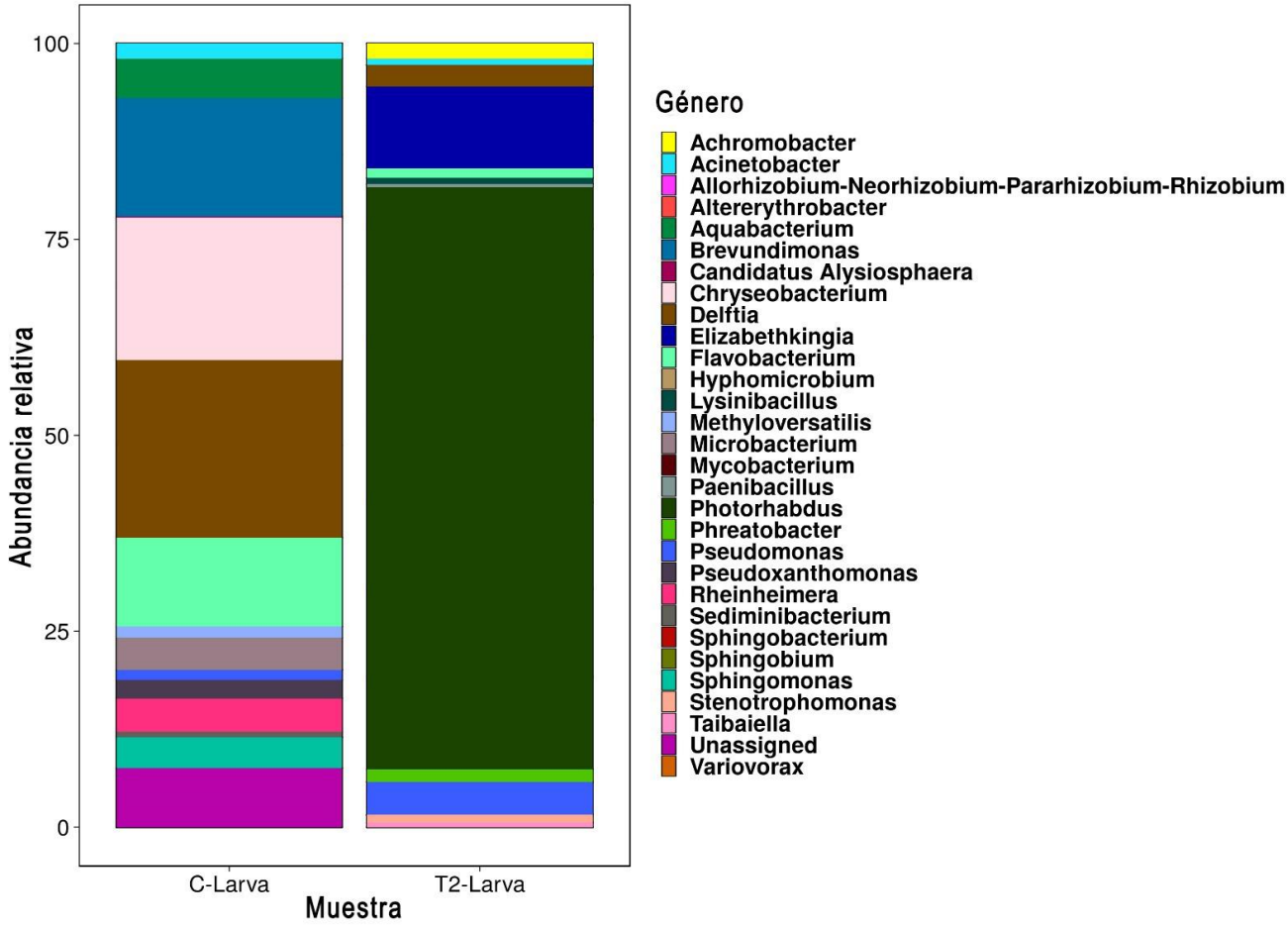

Figura 22. Abundancia relativa de bacterias presentes en las larvas de *Aedes aegypti* infectadas con *Heterorhabditis indica*. Los colores representan la diversidad bacteriana de los géneros presentes en las larvas de mosquito. Las siglas fueron las siguientes: C-Larva: larvas de mosquito del tratamiento de control sin nemátodos; T2-Larva: larva de mosquito del tratamiento 2 (2520 juveniles infectivos de *H. indica* por larva de mosquito).

DISCUSIÓN

En la última fase de este trabajo el objetivo fue aislar una cepa bacteriana de *Photorhabdus* en medios de cultivo dependientes como el NBTA. Una vez teniendo la cepa se podría confirmar con secuenciación sanger y perfilar el estudio a la caracterización de metabolitos secundarios que junto con sus toxinas confieren la capacidad insecticida. Para esto se realizaron estriados de la hemolinfa de larvas de *G. mellonella* infectadas con *H. indica.* Aquí fue el primer reto, ya que después de varias inoculaciones no se lograba aislar a bacterias del género *Photorhabdus.* Por lo que una estrategia fue secuenciar la comunidad bacteriana presente en los cadáveres de *G. mellonella,* y con ayuda de herramientas moleculares de última generación se realizó la secuenciación masiva (Datos publicados, ver anexo). Finalmente se caracterizó una comunidad bacteriana dominada por *Acinetobacter, Pseudomonas, Enterobacter, Bacillus, Stenotrophomonas* y solo en 5% *Photorhabdus.* Wollenberg (2016) realizaron secuenciación de última generación para caracterizar la comunidad bacteriana de cadáveres de *G. mellonella* infectados por heterorhabdítidos. Los autores reportaron 3 géneros de bacterias: *Stenotrophomonas, Enterococus* y *Photorhabdus.* De acuerdo con sus pruebas de laboratorio encontraron que el antibiótico producido por *Photorhabdus* reducía el crecimiento de *Enterococcus,* pero no el crecimiento de *Stenotrophomonas*, enfatizando que estas bacterias afectaban negativamente el crecimiento de *Photorhabdus*.

Después de varias inoculaciones de *H. indica* en larvas de *G. mellonella,* fue posible aislar el simbionte bacteriano objetivo el cual fue identificado como *Photorhabdus hainanensis.* Tailliez et al (2010) caracterizó esta cepa bacteriana como *Photorhabdus luminescens* subsp. *hainanensis*, posteriormente Machado et al (2019) propuso una nueva clasificación elevando *hainanensis* como género.

Del mismo modo, el siguiente paso fue caracterizar la comunidad bacteriana presente en larvas de mosquitos infectadas y no infectadas por *H. indica*. Del mismo modo, se recurrió a herramientas de secuenciación de última generación. Dirksen et al., (2016) han realizo estudios en organismos modelo como *Caenorhabditis elegans*, donde reportaron un microbioma rico en especies pertenecientes a la

familia Enterobacteriaceae y dominada por bacterias del género *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Ochrobactrum* y Sphingomonas. Este enfoque reciente de las interacciones nemátodo/comunidad bacteriana caracterizadas con herramientas moleculares de última generación, revela una relación compartida con bacterias no simbiontes. Autores como Ogier et al. (2020) nombran estas interacciones como patobioma que se describe como el agente patógeno que, junto con su entorno microbiano general, contribuye a la patogénesis. Una vez teniendo un panorama más amplio de toda la comunidad bacteriana presente en larvas de *G. mellonella* y Ae*. aegypti* el siguiente objetivo era caracterizar los metabólicos secundarios que libera *Photorhabdus* ya que estos son los que confieren la capacidad insecticida de la cepa. Para este objetivo se realizó el método de evaporación el cual se realizó en el laboratorio de microbiología de la Universidad de Naresuan, Thailandia durante una estancia. Posteriormente, el procedimiento se continuaría en Cinvestav Mérida, pero a causa de la pandemia SARS-CoV2, el ultimo objetivo no pudo ser concluido.

En cuanto a la comunidad microbiana de insectos infectados con NEPs, constantemente se afirma que *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* establecen una relación monoxénica con el hospedero. Sin embargo, hay varios informes de otras bacterias, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Ochrobactum* spp. y *Acinetobacter* spp., aisladas del intestino y la superficie de *Steinernema carpocapsae* y *Steinernema scapterisci* (Aguillera y Smart, 1993; Lysenko y Weiser, 1974; Poinar y Thomas, 1980). En este trabajo se identificó a *Photorhabdus* como el género dominante en asociación con otros géneros bacterianos como *Pseudomonas* y *Delftia* en el cadáver de *G. mellonella* después de la infección con *H. indica*. Nuestros resultados son semejantes con los reportados por Walsh y Webster, (2003) quienes demostraron que dentro de los cadáveres de larvas de *G. mellonella* infectadas con *Steinernema* puede existir una población dinámica de al menos tres especies bacterianas en este caso, *Xenorhabdus*, *Enterococcus* y *Acinetobacter*. Los autores sugieren que dada la ruta de entrada de *Steinernema* hasta el hemocele es a través de la penetración de la pared del intestino del insecto, es razonable suponer que las

pequeñas perforaciones resultantes faciliten la entrada de las células de bacterias como *Enterococcus*.

CONCLUSIONES

La comunidad microbiana más representada en la infección de larvas de *G. mellonella* y *Ae. aegypti* fue probablemente uno de los factores que determinaron la mortalidad en comparación con el control (larvas de mosquito sin nemátodos). Principalmente, la microbiota encontrada además de *Photorhabdus* en ambos hospederos infectados eran bacterias oportunistas y posiblemente encontrando una entrada directa en el intestino larvario debido al daño físico generado por el nemátodo. Estas bacterias en asociación con *Photorhabdus* colonizan causando sepsis y muerte al hospedero. Por estas razones, es importante esclarecer el papel que juegan estas otras bacterias en la infección del hospedero para la elaboración de alternativas para combatir plagas.

CAPITULO V. DISCUSIÓN GENERAL

En la península de Yucatán existen complejos nemátodos/bacteria con potencial entomopatógenico, específicamente aquellos que pueden matar a las larvas de *Ae. aegypti*. Sin embargo, al encontrar solo 2 especies, nos indica que hay una fauna bastante pobre de NEPs. Diversos estudios sobre diversidad y preferencia de hábitat de los NEPs indican que estos aspectos están relacionados con la densidad de población de sus posibles insectos hospederos, así como de las condiciones de suelo y del equilibrio dinámico de la relación hospedero/parasito (Koppenhöfer y Fuzy, 2006; Půža y Mràček, 2005). Aunque en este trabajo no se encontraron diferencias significativas importantes entre los parámetros del suelo y la presencia o ausencia de NEPs, no se descarta este aspecto. Además, como propone Půža y Mràček (2005), antes de elegir los sitios de muestreo es importante conocer la entomofauna presente en los cultivos o vegetación del lugar para tener un primer filtro de donde colectar con el fin de detectar especies de insectos que puedan actuar de hospederos y no buscar a ciegas. Por otro lado, Yeates (2013) menciona que los nemátodos son una valiosa herramienta que pueden servir como indicadores biológicos y ecológicos ya que presentan una distribución diferencial en los suelos según su grado de conservación, explotación agrícola y contaminantes ambientales afectando directamente a los cultivos y por consiguiente a su entomofauna.

Taxonomía clásica y molecular

Es bien sabido que, para la mayoría de los grupos de nemátodos, los machos se utilizan principalmente para distinguir entre especies, ya que esta etapa es la que presenta diferencias morfológicas cualitativas entre especies. Este es el caso de *Heterhorabditis*, donde los caracteres morfológicos de los machos han sido el principal recurso para describir nuevas especies ya que las hembras o las larvas muestran poca o ninguna diferencia morfológica con sus congéneres. En general, las diferencias en hembras y larvas se limitan a diferencias en los rangos de medida, pero estos rangos pueden generar confusión ya que varias especies pueden tener

rangos superpuestos, por lo que creo que es preferible utilizar alguna diferencia cualitativa para diagnosticar y diferenciar las especies de este grupo de nemátodos. La taxonomía basada en machos puede estar justificada porque puede proporcionar estas diferencias cualitativas, pero también puede tener sus limitaciones, ya que algunas diferencias observables pueden ser la variabilidad fenotípica, lo que ha llevado a la reciente sinonimia de algunas especies del género *Heterorhabditis* (Borkent, 2021). Aun así, considero que lo ideal en las buenas prácticas taxonómicas es tener el mayor número de etapas del ciclo de vida para tener datos comparables con otras descripciones, sin embargo, esto no siempre es posible.

En este caso, los múltiples intentos fallidos de recuperar los machos de la nueva especie me llevaron a un callejón sin salida, por lo que tuve que reconsiderar mis opciones para describir el nuevo taxón. Tuve que regresar a los sitios de recolección varias veces para recolectar muestras de suelo y repetidamente cebar el suelo con trampas para insectos para obtener los NEPs, casi siempre con un resultado negativo. Adicionalmente, cada vez que volvía a las localidades, me percate con cierta preocupación que el entorno está cambiando rápidamente debido a la expansión urbana de las comunidades humanas, además de que cada vez era más difícil acceder a los lugares de acopio de tierras debido a la negativa de los dueños de los cultivos, y aunque he tratado de recuperar NEPs de lugares cercanos, a la fecha no lo he logrado. Cuando finalmente logre obtener infecciones con estos nemátodos, me sorprendió que no todas las etapas de desarrollo pertenecieran a la misma especie y género de nemátodo. Por ello, tras considerar que ya he realizado múltiples e infructuosos esfuerzos para recuperar a los machos y que el acceso a los cultivos se está complicando por cuestiones sociales y porque el punto de colecta ha sido transformado por el entorno urbano, decidí realizar la descripción de la nueva especie de nemátodo sin los machos.

Por un lado, opté por utilizar las etapas de vida que se confirmó pertenecen a la nueva especie. La descripción de la nueva especie en base a hembras y larvas no ha sido fácil, ya que como mencioné anteriormente, no existe mucha diferencia morfológica entre una especie y otra en estos estadios. Sin embargo, he logrado rescatar que la nueva especie tiene un vulva ligeramente protuberante y globosa.

En cuanto al resto de caracteres y medidas morfométricas, es difícil encontrar diferencias precisas, ya que no existen papilas ni ornamentaciones que caractericen a las nuevas especies ni rangos de medidas que no se solapen con otras especies. Por lo tanto, prácticamente estas etapas no son útiles para la diferenciación a nivel de especie.

Por otro lado, también recurrí al uso de secuencias de ADN para realizar el diagnóstico de la nueva especie. El uso de secuencias de ADN para la descripción de especies no es nuevo ya que generalmente se utiliza para confirmar las diferencias entre especies, reforzándolas con el uso de distancias genéticas y con análisis filogenéticos (Nguyen et al., 2004; 2006) pero rara vez se han utilizado explícitamente en la asignación de una especie nueva sin los rasgos morfológicos clave. Sin embargo, aunque el uso de estas secuencias como parte de la identificación de especies no es un enfoque nuevo (Hibbett et al., 2011; Renner, 2016; Fernandez-Triana, 2022), recientemente se ha generado un gran revuelo porque Sharkey et al. (2021) optaron por describir muchas especies nuevas basándose casi exclusivamente en códigos de barras de ADN, que se utilizan explícitamente como diagnóstico de dichas especies. Este tipo de enfoque se conoce como "Taxonomía Turbo", que puede definirse brevemente como la descripción rápida de muchas especies en documentos "rápidos" (Butcher et al. 2012; Fernandez-Triana, 2022). Aunque el enfoque de Sharkey et al (2021) ya ha sido ampliamente discutido en varios artículos (e.g. Fernandez-Triana, 2022), donde hay comentarios tanto positivos como negativos sobre esta forma de hacer taxonomía, particularmente pienso que es una buena aproximación, cuando la descripción de ciertos grupos de especies es difícil; por ejemplo, cuando hay un grupo muy diverso y hay que describir un gran número de especies en poco tiempo; cuando no se encuentren diferencias significativas en la morfología (en el caso de especies crípticas); cuando hay gran variación fenotípica; o como en este caso, donde no se dispone de todos los estadios del ciclo de vida con las características morfológicas clave para la caracterización e identificación específica ya que algunos estadios de vida pueden no ser diagnosticables (como larvas y hembras de *Heterhabditis*) (Hebert, 2003).

En particular, no se realizó taxonomía turbo, ya que en esta tesis no se pretende describir una gran cantidad de especies, además de que se reportan características morfológicas en la descripción de la especie nueva. Lo que sí se rescató del estudio de Sharkey et al (2021) fue el uso explícito de secuencias para la identificación de especies, ya que, a falta de machos para encontrar diferencias robustas, se incluyeron las secuencias de la región ribosomal del ADN nuclear como parte del diagnóstico de la nueva especie. A diferencia de Sharkey et al (2021), en lugar de utilizar la subunidad I de la citocromo oxidasa, que es el gen de "codificación de barras de ADN" preferido, se utilizaron dos marcadores ribosómicos moleculares (ITS y 28S) que se han utilizado ampliamente en este grupo de nemátodos porque son muy efectivos para diferenciar especies (Subkrasae et al., 2022). Además, no solo me limite a colocar la secuencia explícitamente en el texto, ya que también se agregó información de los análisis filogenéticos y las distancias genéticas entre las especies del género *Heterorhabditis*.

En cuanto a las filogenias, estas me sirvieron para conocer las afinidades filogenéticas de *Heterorhabditis* n. sp., y pude observar que la nueva especie anida en un clado donde se han descrito la mayoría de las especies en América, y con el cual tiene poca diferenciación genética en el gen 28S (0.67-0.79), y que esa diferenciación fue mayor en la región ITS (0.66-1.66). La diferencia entre regiones muy probablemente se debió al hecho de que 28S tiene una tasa de sustitución de nucleótidos más lenta en comparación con ITS (Sharkey et al., 2021). A pesar de esto, ambos marcadores presentan diferencias que son confiables para discriminar entre especies estrechamente relacionadas debido a que el ADN no se ve afectado directamente por la variación fenotípica intraespecífica o por el medio ambiente. Por lo tanto, enfatizo que dado que las larvas y hembras de los nemátodos en cuestión no tuvieron diferencias morfológicas que fueran fácilmente diagnosticables, considero que las secuencias de ADN deben incluirse en el diagnóstico de la especie porque representan una evidencia más confiable sobre la presencia de una nueva especie.

Competencia entre NEPs y NBVL

Las interacciones multitroficas que ocurren en el suelo como asociaciones competitivas son necesarias para mejorar la eficiencia y persistencia de NEPs (Stuart et al., 2015). Actualmente, existen registros de la interacción de NEPs compitiendo por recursos contra NBVL, adoptando estrategias como carroñeros para asegurar su supervivencia, pero no está claro el rol que juega cada grupo dentro del hospedero. Campos-Herrera et al., (2012) estudiaron la competencia entre 2 especies de NEPs (*H. megidis* y *S. kraussei*) y 2 especies de NBVL del género *Oscheius* parasitando una larva de insecto. Dentro de los resultados encontraron que la interacción entre estos 2 grupos de nemátodos dependía del número de infectivos juveniles que lograban entrar al hospedero y de la combinación de especie de nemátodo.

Por otro lado, los NBVL pueden facilitar el establecimiento de NEPs al alimentarse de competidores microbianos endógenos del hospedero, permitiendo que el complejo nemátodo/simbionte bacteriano pueda desarrollarse dentro del insecto, siempre y cuando el inoculo de infectivos juveniles no sea demasiado bajo como para no permitir una colonización exitosa.

Cambiando de escenario, también pudiera pensarse que en este trabajo *M. rainai* tomo el papel de entomopatógeno causando enfermedad a las larvas de *G. mellonella* y *Heterorhabditis* n. sp. actuó como carroñero al aprovecharse de los recursos del cadáver del insecto. Blanco-Pérez et al (2019), evaluó la eficacia de NEPs como carroñeros al competir con otros nemátodos y hongos saprófagos con el fin de determinar el impacto posterior de la descendencia de NEPs. Estos autores usaron larvas vivas y congeladas de *G. mellonella* expuestas a *H. bacteriophora* y *S. feltiae* en combinación con el NBVL *Oscheius onirici* y *Aspergillus flavus*. Dentro de los resultados más relevantes reportaron que *S. feltiae* logro reproducirse en *G. mellonella* muerta por congelación, incluso en presencia de organismos saprofitos. Sin embargo, *H. bacteriophora* surgió de una de 192 larvas muertas por congelación y en cantidades bajas, demostrando la incapacidad de esta especie para actuar como carroñeros. En esta tesis se encontró que *M. rainai* interfirió en el ciclo de vida

de *Heterorhabditis* n. sp. dentro de larvas de *G. mellonella*. Se ha observado que los heterorhabdítidos se ven más afectados con la presencia de NBVL dentro del cadáver, en comparación con steinernemátidos que presentan un porcentaje de reproducción más alto (San-Blas y Gowen, 2008). En cuanto a que no se encontraron ejemplares machos de *Heterorhabditis* n. sp., existen trabajos donde se observa que los machos de *Steinernema* matan o dañan físicamente nemátodos competidores de su misma especie u otra especie cuando hay demasiada densidad dentro del hospedero que pudiera amenazar su progenie (Kapranas et al., 2016). Es posible pensar que los machos de *M. rainai* actuaron de igual manera para asegurar su prevalencia. Sin embargo, sería interesante realizar infecciones controladas con ambos grupos para evaluar sus capacidades de competencia por los recursos.

Infección experimental de NEPs contra mosquitos

Los resultados demostraron que las larvas de *Ae. aegypti* fueron susceptibles a *H. indica* (y sus bacterias) recuperadas del estado de Yucatán a una concentración de 2,520 nemátodos por larva de mosquito. Se esperaba que un mayor número de nemátodos produjera una mayor mortalidad. Sin embargo, la concentración de 5.040:1 alcanzó solo el 25% de mortalidad en larvas de mosquito. Una posible explicación del mal desempeño de altas concentraciones de nemátodos en la producción de mortalidad de larvas de mosquitos es la competencia intraespecífica por nutrientes y espacio, lo que a su vez reduce su infectividad y supervivencia cuando aumenta la concentración de nemátodos. Este es un proceso observado previamente por Sen-Selvan, Campbell y Gaugler (1993), quienes compararon el efecto del aumento de *S. carpocapsae* y *H. bacteriophora* en larvas de *G. mellonella*. Los autores informaron que cuando aumentó el número de nemátodos por huésped, disminuyó el porcentaje de penetración. Ciertamente, nuestros resultados sugieren que el uso de concentraciones de nemátodos tan altas como 5,040 JIs/l no es efectivo ni económicamente factible. Sin embargo, ahora que se ha establecido la concentración de nemátodos más efectiva para producir mortalidad de larvas de

mosquitos (2.520 JIs/l), la siguiente tarea será disminuir el número de JIs que mantienen el mismo nivel de mortalidad.

En cuanto a la mortalidad de larvas de mosquitos, Peschiutta, Cagnolo y Almirón, (2014) reportaron la susceptibilidad de *Ae. aegypti* a *H. bacteriophora*, obteniendo un 84% de mortalidad a una concentración de 750 JIs por larva de mosquito. Nuestros resultados contrastan con los reportados en *H. bacteriophora*, ya que una menor concentración de nemátodos fue suficiente para obtener una alta mortalidad en *Ae. aegypti*. Consideramos que los resultados aquí obtenidos son promisorios ya que la cepa de *H. indica* del estado de Yucatán produjo un alto nivel de mortalidad en condiciones ambientales tropicales normales con respecto a la temperatura (>29.6°C; >85.3°F), CaCo3 (408 ppm) y pH (6.88) en comparación con los de Peschiutta, Cagnolo y Almirón, (2014) desarrollados en condiciones de laboratorio a 26°C. Sin embargo, el porcentaje de mortalidad alcanzado con *H. indica* del estado de Yucatán fue superior al obtenido por Pandii et al. (2008) quienes probaron la capacidad infectiva de *S. carpocapsae* y *H. indica* (cepa Local Tai) en *Culex gelidus*, obteniendo una mortalidad del 63% y 13%, respectivamente, a una concentración de 4.000 JIs por larva de mosquito. Claramente, se necesitan bioensayos adicionales donde se expongan las larvas de mosquito a concentraciones más bajas de *H. indica*, así como la valoración de las especies de nemátodos ya reportadas del estado de Yucatán. Aunque en este trabajo no evaluamos las respuestas fisiológicas de las larvas de mosquito a la infección por *H. indica*, se sabe que los NEPs puede causar mortalidad al suprimir la respuesta inmune de los insectos al reducir el número de hemocitos y los niveles de fenoloxidasa (Lalitha et al., 2018).

Las diferencias en la composición bacteriana de las larvas de *Ae. aegypti*

Las secuencias de ARNr 16S permitieron una amplia comparación de la composición bacteriana de las larvas de *Ae. Aegypti* por lo que se pudieron observaron varias diferencias entre los dos tipos de muestras (controles e infectadas). Sin embargo, la principal diferencia fue que *Photorhabdus* fue el género

dominante en las larvas de mosquitos infectados, representando el 74 % de la composición microbiana total. Por lo tanto, sugerimos que el simbionte bacteriano *Photorhabdus*, muy probablemente transportado por *H. indica*, pudo infectar a las larvas de *Ae. aegypti*; algo que no sucedió en las larvas de mosquito no infectadas. Además, el género *Elizabethkingia* también se encontró como parte de la comunidad microbiana de las larvas de mosquito infectadas por NEPs. Boissière et al (2012) informaron que *Elizabethkingia* spp. estaba presente en el 68% de los mosquitos *Anopheles gambiae* recolectado en Camerún. Es muy probable que algunas especies de *Elizabethkingia* sean simbiontes de mosquitos, ya que se han encontrado a lo largo del ciclo de vida de *Ae. aegypti* (Coon et al., 2014).

Solo cuatro géneros se compartieron entre el control y las larvas de mosquitos infectados: *Acinetobacter, Flavobacterium, Delftia* y *Pseudomonas*. Jiménez et al. (2016) reportaron especies de *Pseudomonas* y *Delftia*, que forman parte de la microbiota de NEPs en especies como *Rhabditis regina*, con capacidad de causar mortalidad en *Phyllophaga* sp., *Anomalla* sp. y *G. mellonella*. Otro género bacteriano encontrado en la microbiota de larvas de mosquito infectadas por *H. indica* fue *Achromobacter* que, a pesar de presentar una abundancia relativamente baja (1.90%), aparentemente también podría ser patógeno para los insectos. Por ejemplo, Poinar y Thomas (1966) aislaron *Achromobacter nematophilus* del nemátodo *Neoplectana* sp. al tiempo que demostraron su patogenicidad en larvas de *Galleria mellonella.*

Mediante secuenciación de alto rendimiento, fue posible identificar géneros bacterianos con baja abundancia relativa (<1,2 %) como *Flavobacter, Stenotrophomonas, Acinetobacter, Lysinibacillus, Taibaiella* y *Paenibacillus*. Algunas de estas bacterias han sido reportadas como de baja patogenicidad para las larvas de mosquitos, especialmente las de los géneros *Lysinibacillus* y *Paenibacillus* (Rojas-Pinzón y Dussán, 2017). Cambón et al. (2020) mencionaron que la microbiota 'normal' del huésped puede estar presente sin causar daño, pero en condiciones de estrés específicas, como la infección con NEPs, estas bacterias oportunistas podrían manifestarse si se suprime el sistema inmune del huésped. En el presente estudio se desconoce el papel que juegan estas bacterias durante el

proceso de infección de las larvas de mosquito o su interacción con la capacidad inmune de estas larvas. Por ello, sería pertinente realizar experimentos sobre las infecciones por simbiontes bacterianos de *H. indica* y otras bacterias consideradas entomopatógenas, para formular asociaciones bacterianas con mayor capacidad patógena. Esta es una vía de investigación interesante ya que podría proporcionarnos nuevas interacciones de bacterias y nemátodos que actúen en condiciones ambientales reales contra las larvas de mosquitos.

CONCLUSIONES GENERALES

1. El análisis de las secuencias de nucleótidos, el análisis filogenético del ITS y la morfología de algunos nemátodos aislados de Dzan, Cansahcab y Sucila en esta tesis nos permitió corroborar la identificación taxonómica de *Heterorhabditis* n. sp., *Heterorhabditis indica* y *Metarhabditis rainai.*
2. Se reporta una fuerte competencia intragremial entre una nueva especie de nemátodo nativo *Heterorhabditis* y *M. rainai* el cual clasificamos como cleptoparásito por sustraer los recursos de un cadáver parasitado por NEPs.
3. Los nemátodos bacteriófagos de vida libre (FLBN) pueden interferir en la reproducción de EPN cuando compiten por el mismo hospedero. Ambos grupos de nemátodos pueden actuar como carroñeros facultativos como estrategia de supervivencia.
4. Los NEPs se encontraron en suelos donde se realiza agricultura y ganadería y se clasificaron como suelos arenoso-arcillosos.
5. La cepa local de *H. indica* en asociación con sus bacterias simbiontes tienen la capacidad de inducir una mortalidad del 80% en larvas de *Ae. aegypti*.
6. Las concentraciones más altas de nemátodos (3,780 – 5,040 n/mL) no fueron efectivas para producir una mayor tasa de mortalidad de larvas de mosquitos.
7. La alta mortalidad de *Ae. aegypti* aparentemente estuvo relacionada con bacterias del género *Photorhabdus*, ya que este fue el endosimbionte

numéricamente dominante en comparación con otras bacterias no simbióticas reportadas en este trabajo.

8. En la comunidad bacteriana presente en las larvas de mosquito infectadas por *H. indica*, se identificaron 20 OTUS pertenecientes a 12 géneros. Los géneros dominantes fueron: *Photorhabdus, Elizabethkingia, Pseudomonas, Delftia* y *Stenotrophomonas.*
9. La comunidad bacteriana presente en las larvas de mosquito control (sin nemátodos) presentó 19 OTUS pertenecientes a 14 géneros: *Delftia, Chryseobacterium, Brevundimonas, Flavobacterium,* y *Aquabacterium.*
10. Aun cuando los NEPs y/o sus asociaciones bacterianas simbióticas aparecen como herramientas de biocontrol muy prometedoras para matar larvas de mosquitos, es importante tener mucho cuidado con la liberación de estos organismos al medio ambiente, incluso si son nativos. Esto es especialmente importante para una región como el estado de Yucatán, donde las abejas nativas (e introducidas) son insectos importantes relacionados con la polinización de plantas silvestres, y la apicultura es una actividad económica importante en el campo. Por lo tanto, se deben realizar más estudios para determinar la susceptibilidad de los insectos benéficos como las abejas europeas y las abejas sin aguijón como las Meliponas ante los NEPs y las toxinas liberadas por sus bacterias simbiontes.

BIBLIOGRAFIA

Abramoff, M.D., Magalhães, P.J. y Sunanda, R.J. 2004. Image processing with ImageJ, Igitur Archief - Utrecht Publishing and Archiving Service.

Adams, B.J., Burnell, A.M. y Powers, T.O. 1998. A phylogenetic analysis of *Heterorhabditis* (Nematoda:Rhabditidae) based on internal transcribed spacer 1 DNA sequence data. J. *Nematol*. 30:22-39.

Ahmed N. 2012. Isolation and identification of secondary metabolites producing organisms from marine sponge. Discovery; 10:14-17.

Akhurst, R.J. (1980) Morphological and functional dimorphism in Xenorhabdus spp. bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. *J. Gener Microbiol*, 121, 303-309.

Akhurst, R.J, Boemare, N.E. (1988). A numerical taxonomic study of the genus *Xenorhabdus* (Enterobacteriaceae) and proposed elevation of the subspecies of *X. nematophilus* to species. *J. Gener. Microbiol*, 134: 1835–1845.

Akhurst, R.J. y Boemare, N.E. 1990. Biology and taxonomy of *Xenorhabdus*. In: Gaugler, R. and Kaya, H.K. (eds) *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 75–90.

Akhurst, R.J. 1993. Bacterial symbionts of entomopathogenic nematodes the power behind the throne, In: Bedding, R., Akhurst, R., Kaya, H. (Eds.), *Nematodes and the Biological control of Insect Pests.* CSIRO Publications East, Melboune, Australia, pp. 127-135.

Alatorre-Rosas, R. 1971. El uso de *Neoaplectana dutkyi* Jackson, 1965 (DD-136) Nematoda, Neoaplectanidae en la lucha contra algunas plagas de insecto. Bachelor's thesis, Universidad Autónoma de México, Mexico City, Mexico.

Alekseev, E., Glazer, I. y Samish, M., 2006. Effect of soil texture and moisture on the activity entomopathogenic nematodes against females *Boophilus annulatus* ticks. *Biocontrol* 51, 507–518.

Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E. y Lipman, D. 1990. Basic Local Aligment Search Tool. *J. Mol. Biol*. 215, 403-10. https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2.

Aluja, M. 1994. Bionomics and management of *Anastrepha*. *Annu Rev Entomol*. 39: 155–178.

Alumai, A., Grewal, P.S., Hoy, C.W. y Willoughby, D.A., 2006. Factors affecting the natural occurrence of entomopathogenic nematodes in turfgrass. *Biol. Control.* 36, 368-374. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.08.008.

Amit, U. P., Vijaya, L. K., Sunanda, B. S. y Vinod, P. 2017. Effect of Temperature on Longevity of Entomopathogenic Nematode, *Heterorhabditis indica* Poinar. *Int J Curr Res*, 9(11), 61084-61086.

An, R. y Grewal, P.S. 2011. *Photorhabdus luminescens* subsp. *kleinii* subsp. nov. (Enterobacteriales: Enterobacteriaceae). *Current Microbiology*, 62: 539–543.

Andaló, V., Nguyen, K. y Moino A., 2006. *Heterorhabditis amazonensis* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Amazonas, Brazil. *Nematol.* 8, 853-867. https://doi.org/10.1163/156854106779799286.

Ansari, M. A. y Hussain, M. A. 2020. Indiscriminate feeding of commercial entomopathogenic nematodes caused death of *Aedes aegypti* larvae: potential for vector control of chikungunya, dengue and yellow fever*. Biocontrol Sci Techn, 1–15.https//*doi.org/10.1080/09583157.2020.177

Arriaga, A.A.M. y Cortez-Madrigal, H. 2018. Susceptibility of *Musca domestica* larvae and adults to entomopathogenic nematodes (Rhabditida:

Heterorhabditidae, Steinernematidae) native to Mexico. *J Vector Ecol*, 43: 312-320. https://doi.org/10.1111/jvec.12315.

Aguillera, M., Smart, G., 1993. Development, reproduction, and pathogenicity of *Steinernema scapterisci* in monoxenic culture with different species of bacteria. *J. Invertebr. Pathol.* 62, 289–294.

Ávila-López M.B., García-Maldonado J.Q., Estrada-Medina H., Hernández-Mena D.I., Cerqueda-García D. y Vidal-Martínez V.M. 2021. First record of entomopathogenic nematodes from Yucatán State, México and their infectivity capacity against *Aedes aegypti*. PeerJ. https://doi/10.7717/peerj.11633.

Babic, I., Fischer-Le S.M., Giraud, E. y Boemare, N. 2000. Occurrence of natural dixenic associations between the symbiont *Photorhabdus luminescens* and bacteria related to *Ochrobactrum* spp. in tropical entomopathogenic *Heterorhabditis* spp. (Nematoda, Rhabditida). *Microbiol.* 146, 709-18. https://doi.org/10.1099/00221287-146-3-709.

Bedding, R.A. y Akhurst, R.J. 1975. A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. *Nematol.* 21 (1),109-110. https://doi.org/10.1163/187529275X00419.

Bedding, R.A., Akhurst, R.J. y Kaya, H.K. 1993. Future prospects of entomogenous and entomopathogenic nematodes, In: Bedding, R., Akhurst, R. J., Kaya, H. K. (Eds.), Nematodes and the Biological Control of Insect Pests. East Melbourne, pp. 157-170. http://hdl.handle.net/102.100.100/244689?index=1.

Begg, G.S., Cook, M.S., Dye, R., Ferrante, M., Franck, P., Lavigne, C., Lövei, L.G., Mansion-Vaquie, A., Pell, K.J., Petit, S., Quesada, N., Ricci, B., Wratten, D.S. y Birch, N.A. 2017. A functional overview of conservation biological control. J *Crop Prot*, 97: 145-158, https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.11.008.

Belien, T. (2019). Entomopathogenic nematodes as biocontrol agents of insect pests in orchards. *CABI Reviews*, (2018), 1-11.

Blair, A., Ritz, B., Wesseling, C. y Freeman, L., 2014. Pesticides and human health. *Occup. Environ. Med.* 72 (2). https://doi.org/10.1136/oemed-2014-102454.

Blanco-Pérez, R., Bueno-Pallero, F.A., Vicente-Díez, I., Marco-Mancebón, V.S., Pérez-Moreno, I. y Campos-Herrera, R. (2019). Scavenging behavior and interspecific competition decrease offspring fitness of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae. J. Invertebr. Pathol. 164, 5–15. http://*doi.org/10.1016/j.jip.2019.04.002.

Bode, H., 2009. Entomopathogenic bacteria as a source of secondary metabolites. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13, 224-30. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.02.037.

Boemare, N.E., Akhurst, R.J. y Mourant, R.G. 1993. DNA relatedness between *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae), symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes, and a proposal to transfer *Xenorhabdus luminescens* to a new genus, *Photorhabdus* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 43: 249-255.

Boemare, N.E., Givaudan, A., Brehélin, M. y Laumond, C. 1997. Symbiosis and pathogenicity of nematode–bacterium complexes. *Symbiosis,* 22: 21–45.

Boissière, A., Tchioffo, M.T., Bachar. D., Abate, L., Marie, A., Nsango, S.E., Shahbazkia, H.R., Awono-Ambene, P.H., Levashina, E.A., Christen, R. y Morlais, I. 2012. Midgut microbiota of the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae* and interactions with *Plasmodium falciparum* infection. *PLoS Pathog.* 8. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002742.

Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C., Al-Ghalith, G. A., ... & Bai, Y. 2018. QIIME 2: Reproducible, interactive, scalable, and extensible microbiome data science (No. e27295v1). *PeerJ* Preprints.

Bolaños, T.A., Vega, J. y Cruz, M.I. 2006. Control biológico del picudo negro (*Scyphophorus interstitialis* Gyllenhal) con nemátodos y hongos entomopatógenos en agave en Oaxaca, México.

Borkent A. 2021. Diagnosing diagnoses - can we improve our taxonomy? *Zookeys.* 1071:43-48. https://doi.org/10.3897/zookeys.1071.72904.

Bruno, P., Machado, R.A.R., Glauser, G., Köhler, A., Campos- Herrera, R., Bernal, J., Toepfer, S., Erb, M., Robert, C.A.M., Arce, C.C.M. y Turlings, T.C.J., 2020. Entomopathogenic nematodes from Mexico that can overcome the resistance mechanisms of the western corn rootworm. *Sci. Rep.* 10. https://doi.org/10.1038/s41598-020-64945-x.

Butcher, B.A., Smith, M.A., Sharkey, M.J. y Quicke, D.L. 2012. A turbo-taxonomic study of Thai *Aleiodes* (*Aleiodes*) and *Aleiodes* (*Arcaleiodes*) (Hymenoptera: Braconidae: Rogadinae) based largely on COI barcoded specimens, with rapid descriptions of 179 new species. *Zootaxa* 3457(1): 1–232. https://doi.org/10.11646/zootaxa.3457.1.1

Cadena, S., Aguirre-Macedo, M.L., Cerqueda-García, D., Cervantes, F.J., Herrera-Silveira, J.A. y García-Maldonado, J.Q., 2019. Community structure and distribution of benthic Bacteria and Archaea in a stratified coastal lagoon in the Southern Gulf of Mexico. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 230, 106433. https://doi.org/10.1016/j.ecss.2019.106433.

Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. methods*, 13, 581.

Cambón, M.C., Lafont, P., Frayssinet, M., Lanois, A., Ogier, J.C., Pagès, S., Parthuisot, N., Ferdy, J.B. y Gaudriault, S., 2020. Bacterial community profile after the lethal infection of *Steinernema-Xenorhabdus* pairs into soil-reared *Tenebrio molitor* larvae. FEMS *Microbiol. Ecol*. 96. https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa009.

Campbell, J. y Gaugler, R. 1993. Nictation Behaviour and Its Ecological Implications in the Host Search Strategies of Entomopathogenic Nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae). *Behaviour,* 126: 155-169. https://doi.org/10.1163/156853993X00092.

Campos–Herrera, R., El–Borai, F.E. y Duncan, L.W. 2012. Wide interguild relationships among entomopathogenic and free–living nematodes in soil as measured by real time qPCR. *J. Invertebr. Pathol*. 111, 126–135.

Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., a Huttley, G., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., a Lozupone, C., Mcdonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., a Walters, W., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J. y Knight, R. 2010. QIIME allows analysis of highthroughput community sequencing data. *Nature* 7, 335–336. https://doi.org/ 10.1038/nmeth.f.303.

Cardoso, D.D., Gomes, V.M., Dolinski, C.D., y Souza, R.M. 2015. Potential of entomopathogenic nematodes as biocontrol agents of immature stages of *Aedes aegypti.* https://doi.org/10.4322/NEMATODA.09015.

Challinor V.L., Bode H.B. 2015. Bioactive natural products from novel microbial sources. *Ann. Acad. Sci.* 1354:82–97.

Chandra, G., Ghosh, A., Bhattacharjee, I. y Ghosh, S.K. 2013. Use of larvivorous fish in biological and environmental control of disease vectors. Cameron MM, Lorenz LM, eds, 25-41.

Chaudhary, M., Majeed, S., Tayyib, M., Farzand, A., Moosa, A., Shehzad, M. y Mushtaq, F. 2017. Antagonistic potential of *Steinernema kraussei* and *Heterorhabditis bacteriophora* against Dengue fever mosquito *Aedes aegypti*. *J. Entomol. Zool. Stud*. 5, 865-869.

Chitra, P., Sujatha, K. y Alagarmalai, J., 2017. Entomopathogenic nematode as a biocontrol agent – Recent trends – A Review. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.* 4, 9-20. https://doi.org/10.22192/ijarbs.2017.04.01.002.

Clarke DJ. 2014. The genetic basis of the symbiosis between *Photorhabdus* and its invertebrate hosts, p 1–29. *In* Sariaslani S, Gadd GM (ed), *Adv. Appl. Microbiol*. 88th ed. Elsevier, San Diego, CA.

Coon, K.L., Vogel, K.J., Brown, M.R. y Strand, M.R., 2014. Mosquitoes rely on their gut microbiota for development. *Mol. Ecol.* 23, 2727-2739. https://doi.org/10.1111/mec.12771.

Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R. y Posada, D., 2012. jModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods*. *9*, 772. https://doi.org/10.1038/nmeth.2109.

Dhakal, M., Nguyen, K.B., Hunt, D.J., Ehlers, R., Spiridonov, S.E. y Subbotin, S.A., 2020. Molecular identification, phylogeny and phylogeography of the entomopathogenic nematodes of the genus *Heterorhabditis* Poinar, 1976: a multigene approach. *Nematol.* 1-17. https://doi.org/10.1163/15685411-bja10052.

Dhillon, M.J. and M. S. Mulla. 1980. Evaluation of the nematode *Romanomermis culicivorax* against cemetery mosquitoes. *Mosquito News* 40: 531-535.

Díaz-Badillo, A., Bolling, B. G., Perez-Ramirez, C. G., Moore, J. P., Martinez-Munoz, A. A., Padilla-Viveros, M., Camacho-Nuez, A., Diaz-Perez, B. J., and Munoz M. L. 2011. The distribution of potential West Nile virus vectors, *Culex pipiens pipiens* and *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae), in Mexico City. *Parasites Vector*s 4:70.

Didiza, L., Lephoto, T.E. y Gray, V.M. 2021. Morphological and molecular phylogenetic description of Steinernema batswanae n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae): a new species of an entomopathogenic nematode from South

Africa. *Arch. Phytopathol. Plant. Prot.* https://doi.org/10.1080/03235408.2021.1931648

Dilipkumar, A., Karthik, R.R., Chinnaperumal, K., Balasubramani, G., Paramasivam, D., Arul, D. y Pachiappan, P. 2019. Isolation and growth inhibition potential of entomopathogenic nematodes against three public health important mosquito vectors. *Exp. Parasitol*. 197, 76-84. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.11.001.

Dillman, A.R., Chaston, J.M., Adams, B.J., Ciche, T.A. y Goodrich-Blair, H. 2012. An Entomopathogenic Nematode by Any Other Name. *PLoS Pathog*. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002527.

Dirksen, P., Marsh, S.A., Braker, I. 2016. The native microbiome of the nematode *Caenorhabditis elegans*: gateway to a new host-microbiome model. *BMC Biol***.** 38. https://doi.org/10.1186/s12915-016-0258-1.

Dolinski, C., Kamitani, F.L., Machado, I.R. y Winter, C.E. 2008. Molecular and morphological characterization of *heterorhabditid* entomopathogenic nematodes from the tropical rainforest in Brazil*. Mem.* Inst. Oswaldo Cruz. 103, 150-159. https://doi.org/10.1590/S0074-02762008000200005.

Duncan, L.W., Dunn, D.C., Bague, G. y Nguyen, K., 2003. Competition between entomopathogenic and free-living bactivorous nematodes in larvae of the weevil *Diaprepes abbreviatus*. *J. Nematol*. 35, 187–193.

Edmunds, C. V., Wilding, C. S. y Rae, R. 2017. Susceptibility of Chironomus plumosus larvae (Diptera: Chironomidae) to entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae): Potential for control. *Eur. J. Entomol*. 114, 526-532. https://doi.org/10.14411/eje.2017.067

Eivazian, K.N., Mohammadi, D. y Girling, R., 2017. New reports on dixenic associations between the symbionts of entomopathogenic nematodes,

Photorhabdus and *Xenorhabdus*, and non-symbiotic bacteria*. J. Crop Prot.* 6 (4), 497-511.

Engel, P. y Moran, N., 2013. The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. FEMS *Microbiol. Rev.* 37, 699–735. https://doi.org/10.1111/1574-6976.12025.

Enright, M., Griffin. (2004). Specificity of Association between *Paenibacillus* spp. and the Entomopathogenic Nematodes, *Heterorhabditis* spp. *Microbial ecology*, 48: 414-23. https://doi.org/10.1007/s00248-003-0166-0.

Fernandez-Triana, J. 2022. Turbo taxonomy approaches: lessons from the past and recommendations for the future based on the experience with Braconidae (Hymenoptera) parasitoid wasps. *ZooKeys*. 1087. 199-220. https://doi.org/10.3897/zookeys.1087.76720.

Finney, D.J. 1971. Probit Analysis, third Ed. Cambridge University Press, London.

Fischer-Le, S.M., Viallard, V., Brunel, B., Normand, P. y Boemare, N.E. 1999. Polyphasic classification of the genus *Photorhabdus* and proposal of new taxa: *P. luminescens* subsp. *luminescens* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *akhurstii* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *laumondii* subsp. nov., *P. temperata* sp. nov., *P. temperata* subsp. *temperatas* subsp. nov. and *P. asymbiotica* sp. nov. *Int. J. Bacteriol.* 49: 1645–1656.

Frackman, S., Anhalt, M. y Nealson, K.H. (1990). Cloning, organization, and expression of the bioluminescence genes of *Xenorhabdus* luminescens. *J. Bacteriol.* 172: 576–577.

García-Varela, M. y Nadler, S.A., 2005. Phylogenetic relationships of Palaeacanthocephala (Acanthocephala) inferred from SSU and LSU rDNA gene sequences. *J. Parasitol*. 91, 1401-1409. https://doi.org/10.1645/GE-523R.1.

Gaugler, R. y Kaya, H. (1990). Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. In: Gaugler, R. y Kaya, H.K. (Eds). CRC Press. Pp. 365.

Gaugler, R., Wang, Y.I. y Campbell, J.F. 1994. Aggressive and evasive behaviors in *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae: Defenses against entomopathogenic nematode attack. *J. Invertebr. Pathol.* 64: 193-199. https://doi.org/10.1016/S0022-2011(94)90150-3.

Gee, G.W. y Bauder, J.W., 1986. Particle-size analysis, In: Klute A. (Eds.) Methods of soil analysis. Part 1. 2nd ed. Agron. Monogr. 9. ASA and SSSA. Madison, WI, pp. 383-411.

Georgis, R. y Gaugler, R. 1991. Predictability in biological control using entomopathogenic nematodes. *J. Econ. Entomol.* 84: 713-720.

Girón, P.S., Ruiz, V.J., Pérez, P.R., Sánchez, G.J.A. y Aquino, B.T., 2012. Isolation of entomopathogenic nematodes and control of *Phyllophaga vetula* Horn in Oaxaca, México. *Afr. J. Biotechnol*. 11, 16525-16531. https://doi.org/10.5897/AJB12.448.

Glare, T.R., Jurat-Fuentes, J.L. y O'Callaghan, M. 2017. Basic and applied research: entomopathogenic bacteria. In: Lacey, L.A. (ed) *Microbial control of insect and mite pests.* Academic Press, pp 47–67.

Glaser, S.P., Tobias, N.J., Thanwisai, A., Chantratita, N., Bode, H.B., Kampfer, P. (2017). *Photorhabdus luminescens* subsp. *namnaonensis* subsp. nov., isolated from *Heterorhabditis baujardi* nematodes. *International Journal of Syst. Evolution. Microbiol*, 67:1046–1051.

Gouge, D.H. y Snyder, J.L. 2006. Temporal association of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) and bacteria*. J. Invertebr. Pathol.* 91, 147-157. https://doi.org/10.1016/j.jip.2005.12.003.

Grewal, P.S. y Georgis R. 1999. Entomopathogenic nematodes. Pp. 271–299 *in* F. R. Hall, and J. J. Menn, eds. Methods in Biotechnology, vol. 5: Biopesticides: Use and Delivery. Totowa, NJ: Humana Press.

Grewal, P.S., Nardo E.A. y Aguillera M.M. 2001. Entomopathogenic nematodes: potential for exploration and use in South America. *Neotrop. Entomol*. 30(2):191-205.

Grewal, P.S., Ehlers, R.U. y Shapiro-Illan, D.I. 2005. Critical issues and research needs for expanding the use of nematodes in biocontrol. *In*: Grewal, P.S., Ehlers, R.U. and D. Shapiro-Ilan, eds. Nematodes as Biocontrol Agents. Wallingford, UK: CABI Publishing. Pg. 479–489.

Grifaldo-Alcantara, P., Alatorre-Rosas, R., Segura-León, O. y Hernandez-Rosas, F. 2017. *Steinernema ralatorei* n. sp. Isolated from Sugarcane Areas at Veracruz, Mexico. *Southwest. Entomol.* 42: 171-190.

Grifaldo-Alcántara, P., Alatorre-Rosas, R., Hernández, F., Acuna-Soto, J., Martínez-Martínez, R., Pérez-Rodríguez, A., Azuara, A. y Vargas-Madriz, H. 2019. Virulence, Exposure Time, Penetration, and Propagation of *Steinernema ralatorei* Grifaldo in the Sugarcane Borer, *Diatraea saccharalis* Fabricius. *Southwest. Entomol*. 44: 679. https://doi.org/10.3958/059.044.0313.

Grifaldo-Alcántara, P., Alatorre, R., Villanueva-Jiménez, J., Hernández, F., Stock, S. P. y Ramírez-Valverde, G. 2020. Evaluación de dos cepas de nematodos (Steinernematidae, Heterorhabditidae) para el control del salivazo (Hemíptera: Cercopidae) en caña de azúcar. *Nematropica*, 49: 83-90.

Hatting, J., Stock, P. y Hazir, S. 2009.Diversity and distribution of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae, Heterorhabditidae) in South Africa. *J. Invertebr. Pathol.* 102, 120-128. https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.07.003.

Hazir, S., Stackebrandt, E., Lang, E., Schumann, P., Ehlers, R.U., Keskin, N. 2004. Two new subspecies of *Photorhabdus luminescens*, isolated from *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda: Heterorhabditidae): *Photorhabdus*

luminescens subsp. *kayaii* subsp. nov. and *Photorhabdus luminescens* subsp. *thracensis* subsp. nov. *Syst. Appl. Microbiol*, 27:36–42

Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. y deWaard, J. R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. Royal Soc. B. Sc. 270, 313–321.https://*doi.org/10.1098/rspb.2002.2218

Helmberger, M.S., Shields, E.J. y Wickings, K.G. 2017. Ecology of belowground biological control: Entomopathogenic nematode interactions with soil biota. Appl. Soil Ecol. 121, 201–213. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.10.013

Herrera-Silveira, J.A. y Comín, F. A. 2000. An Introductory account of the types of aquatic ecosystems of Yucatan Peninsula (SE Mexico). Pp. 213-227, in M. Munawar, S.G. Lawrence, I.F. Munawar and D.F. Malley (eds.): Ecovision World Monographs Series. Aquatic Ecosystems of Mexico: Status & Scope. Backhuys Pub. Leiden, Netherlands.

Hibbett, D.S., Ohman, A., Glotzer, D., Nuhn, M., Kirk, P. y Nilsson, R.H. 2011. Progress in molecular and morphological taxon discovery in Fungi and options for formal classification of environmental sequences. *Fungal Biol. Rev.* 25, 38–47. https://doi.org/10.1016/j.fbr.2011.01.001

Hinchliffe, S.J., Hares, M., Dowling, A., French-Constant, R. (2010). Insecticidal Toxins from the *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* Bacteria. *Open Toxicol. J.*, 3: 101-118.

Hominick, W.M. 2002. Biogeography. In: Gaugler, R. (Ed.). Entomopathogenic Nematology. Wallingford, UK: CABI Publishing. pp. 115-143.

Hoy, M.A. 2008a. Classical Biological Control. In: Capinera J.L. (ed) Encyclopedia of Entomology. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6359-6_698.

Hoy, M.A. 2008b. Augmentative Biological Control. In: Capinera, J.L. (ed) Encyclopedia of Entomology. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6359-6_10394.

Hussaini, S. S., Singh, S. P., Parthasarathy, R. y Shakeela, V. 2000. Storage effects on activity of native *Steinernema* and *Heterorhabditis* spp. *Indian J. Nematol*, 30.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (México). Anuario estadístico y geográfico de Yucatán 2015 / Instituto Nacional de Estadística y Geografía.-- México : INEGI, c2015.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (México). Anuario estadístico y geográfico de Yucatán 2017 / Instituto Nacional de Estadística y Geografía.-- México : INEGI, c2017.

Jackson, T., Wang, H., Nugent, M.J., Griffin, C.T., Burnell, A.M. y Dowds, B.C.A., 1995. Isolation of insect pathogenic bacteria, *Providencia retfgeri*, from *Heterorhabditis* spp. *J. Appl. Bacteriol. 78*, 237-244. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1995.tb05022.x.

Jiménez, C.J.G., Canales, L.J., Lara, R.N., Rosenblueth, M., Martínez, R.E. y Contreras, G.J., 2016. Microbiota from *Rhabditis regina* may alter nematode entomopathogenicity. *Parasitol. Res.* 115, 4153-4165. https://doi.org/10.1007/s00436-016-5190-3.

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

Kapranas, A., Maher, A.M., Griffin C.T., 2016. Higher relatedness mitigates mortality in a nematode with lethal male fighting. *J. Evol. Biol*. 29, 344-351.

Kaya, H.K. y Stock, S.P. 1997. Techniques in insect nematology, In: Lacey L. A. (Eds.), Manual of techniques in insect pathology. Academic Press, London, pp. 281-324. https://doi.org/10.1016/B978-012432555-5/50016-6.

Kaya, H. A., Alumai, M.M., Choo, H.Y., Torre, M., Fodor, A., Ganguly, S., Hazir, S., Lakatos, T., Pye, A., Wilson, M., Yamanaka, S., Yang, H., Ehlers, R. 2006. Status of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria from selected countries or regions of the world. *Biol. Control*. 38. 134-155. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.11.004.

Kinney, M. P., Panting, N. D. y Clark, T. M. 2014. Modulation of appetite and feeding behavior of the larval mosquito *Aedes aegypti* by the serotonin-selective reuptake inhibitor paroxetine: shifts between distinct feeding modes and the influence of feeding status. *J Exp Biol,* (6): 935–943. https://doi.org/10.1242/jeb.094904

Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M. y Glöckner, O. 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 41 (1) https://doi.org/10.1093/nar/gks808.

Koppenhöfer, A.M. y Fuzy, E.M. 2003. *Steinernema scarabaei* for the control of white grubs. *Biol. Control*. 28:47–59.

Koppenhöfer, A.M., Fuzy, E.M., 2006. effect of soil type on infectivity and persistence of the entomopathogenic nematodes *Steinernema scarabaei, Steinernema glaseri, Heterorhabditis zealandica,* and *Heterorhabditis bacteriophora.* J. Invertebr. Pathol. 92: 11–22.

Koppenhöfer, H.S. 2007. Bacterial symbionts of *Steinernema* and *Heterorhabditis*. In: Nguyen, K.B., Hunt, D.J. (eds) Entomopathogenic nematodes:

systematics, phylogeny and bacterial symbionts. Brill Academic Publishers (nematology monographs and perspectives, 5), Leiden-Boston, pp 735–808

Koul, O. y Cuperus, G.W. 2007. Ecologically Based Integrated Pest Management. CAB International, Wallingford, UK.

Kovendan, K., Chandramohan, B., Govindarajan, M., Jebanesan, A., Kamalakannan, S., Vincent, S. y Benelli, G., 2018. Orchids as sources of novel nanoinsecticides? Efficacy of *Bacillus sphaericus* and *Zeuxine gracilis*-fabricated silver nanoparticles against dengue, malaria and filariasis mosquito vectors. *J. Clust. Sci.* 29, 345-357. https://doi.org/10.1007/s10876-018-1331-4.

Kusch, R.S., Lemaitre, B. (2000). Genes that fight infection: what the *Drosophila* genome says about animal immunity. *Trends in Genetics,* 16: 442–449.

Kuo, S., 1996. Phosphorus, In: Sparks D.L. (Eds.), Methods of Soil Analysis Part 3: Chemical Methods. SSSA Book Series 5, Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, pp. 869-920.

Lacey, L.A. y Kaya, H.K. 2000. Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology. *J. Invertebr. Pathol.* 84, 15-23. https://doi.org/10.1007/978-94-017-1547-8.

Lacey, L.A., Arthurs, S.P., Unruh, T.R., Headrick, H. y Fritts, R. Jr. 2006. Entomopathogenic nematodes for control of codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) in apple and pear orchards: effect of nematode species and seasonal temperatures, adjuvants, application equipment and post-application irrigation. *Biol. Control.* 37:214–223.

Lacey, L., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D.I., Frutos, R., Brownbridge, M. y Goettel, M. 2015. Insect pathogens as biological control agents: back to the future. *J. Invertebr. Pathol.* 132: 1-41.

Lalitha, K., Karthi, S., Vengateswari, G., Karthikraja, R., Perumal, P. y Shivakumar, M. S., 2018. Effect of entomopathogenic nematode of *Heterorhabditis*

indica infection on immune and antioxidant system in lepidopteran pest *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Parasit. Dis*. 42, 204 211. https://doi.org/10.1007/s12639-018-0983-1.

Lewis, E., Gaugler, R. y Harrison, R. 1992. Entomopathogenic nematode host finding: Response to host contact cues by cruise and ambush foragers. *Parasitology*. 105: 309 - 315. https://doi.org/10.1017/S0031182000074230.

Lewis, E.E. 2002. Behavioral ecology. In: Gaugler, R. (Ed.). Entomopathogenic nematology. Wallingford: CABI Publishing, Cap. 10, p.205-224.

Lewis, E.E. y Clarke, D.J. 2012. Nematode parasites and entomopathogens. Pp. 395–424 *in:* Vega, F. and Kaya, H. K. (eds). *Insect Pathology*, 2nd ed. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier.

Li, X., Cowles, R., Cowles, E., Gaugler, R., Cox-Foster, D. (2007). Relationship between the successful infection by entomopathogenic nematodes and the host immune response. *Intern, J. parasitol,* 37: 365-74. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.08.009.

Lisnawita, L., Torres-Barragan, A. y Cardoza, Y. 2010. *Oscheius carolinensis* n. sp. (Nematoda: Rhabditidae), a potential entomopathogenic nematode from vermicompost. *Nematology*,12:121-135. https://doi.org/10.1163/156854109x45846.

Lysenko, O., Weiser, J., 1974. Bacteria associated with the nematode Neoaplectana carpocapsae and the pathogenicity of this complex for *Galleria mellonella* larvae. *J. Invertebr. Pathol*. 24, 332– 336.

Machado, R.A., Bruno, P., Arce, C.C.M., Liechti, N., Köhler, A., Bernal, J., Bruggmann, R. y Turlings, T.C.J. 2019. *Photorhabdus khanii* subsp. *guanajuatensis* subsp. nov., isolated from *Heterorhabditis atacamensis,* and *Photorhabdus luminescens* subsp. *Mexicana* subsp. nov., isolated from *Heterorhabditis mexicana* entomopathogenic nematodes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 69: 652–661. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003154.

MacKenzie J.S., Gubler D.J. y Petersen L.R. 2004. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile, and dengue viruses. *Nat. Med.* 10: 98-107.

Malan, A.P., Knoetze, R. y Tiedt, L., 2014. *Heterorhabditis noenieputensis* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae), a new entomopathogenic nematode from South Africa. *J. Helminthol*. 88, 139-51. https://doi.org/10.1017/S0022149X12000806.

Malan, A. y Ferreira, T. 2017. Entomopathogenic Nematodes. In: Nematology in South Africa: A View from the 21st Century (459-40). https://doi.org/10.1007/978-3-319-44210-5_22.

Molina-Ochoa, J., Lezama-Gutierrez, R., Gonzalez-Ramirez, M., Lopez-Edwards, M., Rodriguez-Vega, M. y Arceo-Palacios, F. 2003. Pathogens and parasitic nematodes associated with populations of fall armyworm (lepidoptera: noctuidae) larvae in Mexico. *Fla. Entomol.* 86: 244-253.

Murfin, K.E., Lee, M.M., Klassen. J.L., Larget, B., Forst, S., Stock, S.P., Currie, C.R. y Goodrich-Blair, H. 2015. *Xenorhabdus bovienii* strain diversity impacts coevolution and symbiotic maintenance with *Steinernema* spp. nematode hosts. *mBio*, 6 (3).

Nadler, S.A. y Hudspeth, D.S.S. 1998. Ribosomal DNA and phylogeny of the Ascaridoidea (Nemata: Secernentea): Implications for morphological evolution and classification. *Mol. Phylogenetics. Evol.* 10, 221-236. https://doi.org/10.1006/mpev.1998.0514.

Nawaz, M., Mabubu, J.I. y Hua, H. 2016. Current status and advancement of biopesticides: microbial and botanical pesticides. *J. Entomol. Zool. Stud.* 4:241–246.

Nelson, D.W. y Sommers, L.E. 1996. Total carbon, organic carbon, and organic matter, In: Sparks D.L. (Eds.), Methods of Soil Analysis: Part 3. Chemical Methods, Agronomy Monograph. American Society of Agronomy-Soil Science

Society of America, Madison, Wisconsin, pp. 961-1010. https://doi.org/10.2136/sssabookser5.3.c34.

Nguyen, K.B., Smart, G.C. Jr. (1991). Mode of entry and sites of development of *Steinernema scapterisci*. *Journal of Nematology,* 23: 267-268.

Nguyen, N.C., Shapiro, I., Stuart, D.L., McCoy, R.J., James, R.R. y Adams, B.J., 2004. *Heterorhabditis mexicana* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Tamaulipas, Mexico and morphological studies of the bursa of *Heterorhabditis* spp. *Nematol*. 6, 231-244. https://doi.org/10.1163/1568541041218031.

Nguyen, K.B., Mrek, Z.K. y Webster, J.M., 2006. Morphological and molecular characterization of a new isolate of *Steinernema feltiae* (Filipjev, 1934) from Vancouver, Canada, with morphometrical comparison with the topotype population from Russia. *Zootaxa*. 1132, 51-619. https://doi.org/10.11646/zootaxa.1132.1.3

Nguyen, K.B., Gozel, U., Koppenhöfer, H. y Adams, B. 2006. *Heterorhabditis floridensis* n. sp (Rhabditida : Heterorhabditidae) from Florida. *Zootaxa*. 1177. 1-19. https://doi.org/10.11646/zootaxa.1177.1.1.

Nguyen, K.B., Shapiro, I.D. y Mbata, G.N. 2008. *Heterorhabditis georgiana* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Georgia, USA. *Nematol.* 10, 433-448. https://doi.org/10.1163/156854108783900276.

Nthenga, I., Knoetze, R., Berry, S., Tiedt, L.R. y Malan, A.P. 2014. *Steinernema sacchari* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from South Africa. *Nematol.* 16, 475-494. https://doi.org/10.1163/15685411- 00002780.

Ogier, J.C., Pagès, S., Frayssinet, M. y Gaudriault, S. 2020. Entomopathogenic nematode-associated microbiota: from monoxenic paradigm to pathobiome. *Microbiome*, 8 (25). https://doi.org/10.1186/s40168-020-00800-5.

Orozco, R.A., Hill, T., Stock, S.P. (2013). Characterization and phylogenetic relationships of *Photorhabdus luminescens* subsp. *sonorensis* (γ- Proteobacteria:

Enterobacteriaceae), the bacterial symbiont of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis sonorensis* (Nematoda: Heterorhabditidae). *Current Microbiology*, 66:30–39.

Olvera, A., Benoit, P., Barriuso, E. y Ortiz, L., 2008. Sorption and desorption of organophosphate pesticides, parathion and cadusafos, on tropical agricultural soils. Agron. Sustain. Dev. 28, 231-238. https://doi.org/10.1051/agro:2008009.

Pandii W., Maharmart, S., Boonchuen, S., Silapanuntakul, S. y Somsook, V. 2008. Efficacy of entomopathogenic nematodes (Nematoda: Rhabditida) against *Culex gelidus* (Diptera: Culicidae) larvae. *J. Vector Borne Dis*. 5, 24-35.

Patrick Jr. W.H., Gambrell, R.P. y Faulkner, S.P. 1996. REDOX measurements of soils, In: Sparks D.L. (Eds.), Methods of Soil Analysis: Part 3. Chemical Methods, Agronomy Monograph. American Society of Agronomy-Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, (pp. 1085-1123). https://doi.org/10.2136/sssabookser5.3.c42.

Peschiutta, M.L., Cagnolo, S.R. y Almirón, W.R. 2014. Susceptibility of larvae of *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae) to entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar) (Rhabditida: Heterorhabditidae). *Rev. Soc. Entomol.* Argent. 73, 99-108.

Petersen, J. J. y Willis, O. R. 1970. Some factors affecting parasitism by mermithid nematodes in southern house mosquito larvae, *J. Econ. Entomol*., 63: 175

Plante, A.F., Conant, R.T., Stewart, C.E., Paustian, K. y Six, J., 2006. Impact of soil texture on the distribution of soil organic matter in physical and chemical fractions. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 70, 287-296. https://doi.org/10.2136/sssaj2004.0363.

Poinar Jr., G.O. y Thomas, G.M., 1966. Significance of *Achromobacter nematophilus* Poinar and Thomas (Achromobacteraceae:Eubacteriales) in the development of the nematode, DD-136 (Neoaplectana sp., Steinernematidae). *Parasitology,* 56, 385-390. https://doi.org/10.1017/s0031182000070980.

Poinar, G.O. Jr. 1976. "Description and biology of a new insect parasitic rhabditoid, *Heterorhabditis bacteriophora* n. gen., n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae n. fam.)." *Nematologica* 21:463-470.

Poinar, G.O., Jr. 1979. Nematodes for Biological Control of Insects. CRC Press, Boca Raton. 277 pp.

Poinar, G.O. Jr., Hess, R.T. y Thomas, G. 1980. Isolation of defective bacteriophages from *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae). *IRCS Medical Science*, 8:141.

Poinar, G.O. Jr., and Kaul, H. N. (1982). Parasitism of the Mosquito *Culex pipiens* by the Nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. *J. Invertebr. Pathol* 39: 382-387.

Poinar, G.O. Jr. 1990. Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabitidae. In: Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. R. Gaugler y H.K. Kaya, Eds. CRC Press. Boca Raton, Fla. p. 23-61.

Poinar, G.O. 1993. Origins and phylogenetic relationships of the entomophilic rhabditis, *Heterorhabditis* and *Steinernema*. *Fundam. Appl. Nematol*. 16(4):333-338.

Polanco, R.A.G., Navarro, A.J.N., Solorio S.J., Mena, R.G.J., Marrufo, G.J.M., Del Valls Casillas, T.A. 2015. Contamination by organochlorine pesticides in the aquifer of the Ring of Cenotes in Yucatán, México. *Water Environ J*. 29, 140-150.

https://doi.org/10.1111/wej.12080.

Půža, V. y Mráček, z., 2005. Seasonal dynamics of entomopathogenic nematodes of the genera *Steinernema* and *Heterorhabditis* as a response to abiotic factors and abundance of insect hosts. *J. invertebr. Pathol.* 89: 116–122.

Qiu, L., Zhao, J., Wu, Z., Ly, Z., y Pang, Y. 2011. *Steinernema Pui* sp. n. (Rhabditida, Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Yunnan, China, pp. 1-13 in Zootaxa 2767 on page 3, https://doi.org/10.5281/zenodo.206861.

Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F. (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic acids res.* 41.

Rambaut, A. 2016. FigTree v1.4.3. Molecular Evolution, Phylogenetics and Epidemiology. http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/ (accessed 7 January 2021).

Renner, S.S. 2016. A return to Linnaeus's focus on diagnosis, not description: the use of DNA characters in the formal naming of species. *Systematic Biology* 65(6): 1085–1095. https://doi.org/10.1093/sysbio/syw032.

Rhoades, J.D. 1996. Salinity: electrical conductivity and total dissolved solids, In: Sparks D.L. (Eds.), Methods of Soil Analysis: Part 3. Chemical Methods, Agronomy Monograph. American Society of Agronomy-Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, pp. 417-436. https://doi.org/10.2136/sssabookser5.3.c14.

Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., y Mahé, F. (2016). VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. PeerJ, 4, e2584.

Rodríguez, D., Torres, M., Uribe, L. y Flores, L. 2009. Susceptibilidad de los estadios L2 y L3 de *Phyllophaga elenans* a una cepa nativa de *Heterorhabditis* sp. en condiciones de invernadero. *Agron. Costarricense.* 33, 171-182.

Rojas-Pinzón, P.A., Dussán, J., 2017. Efficacy of the vegetative cells of *Lysinibacillus sphaericus* for biological control of insecticide-resistant *Aedes aegypti. Parasites Vectors*. 10, 231. https://doi.org/10.1186/s13071-017-2171-z.

Sajnaga, E. y Kazimierczak, W. 2020. Evolution and taxonomy of nematode-associated entomopathogenic bacteria of the genera *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: an overview. *Symbiosis*, 80: 1-13. https://doi.org/10.1007/s13199-019-00660-0.

Saleh, M.M.E., Hanounik, S.B., Al-muhanna, U.E., Al-dahir, H. y Al-garrash, Z.H., 2001. Distribution of *Heterorhabditis indica* (Nematoda: Heterorhabditidae) in eastern Saudi Arabia. *Int. J. Nematol.* 11, 215-218.

Salgado-Morales, R., Martínez-Ocampo, F., Obregón-Barboza, V., Vilchis-Martínez, K., Jiménez-Pérez, A. y Dantan, E. 2019. Assessing the pathogenicity of two bacteria isolated from the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis indica* against *Galleria mellonella* and some pest insects. *Insects.* 10. https://doi.org/10.3390/insects10030083.

Sambeek, J., Wiesner, A. (1999). Successful parasitation of locusts by entomopathogenic nematodes is correlated with inhibition of insect phagocytes. *J. Invertebr. Pathol*, 73:154–161.

Sánchez-Saavedra, M.G., Cortez-Madrigal, H. y Cristobal-Acevedo, D. 2012. Infectividad de *Heterorhabditis indica* (Rhabditida: Heterorhabditidae) en adultos y larvas de gallina ciega (Coleoptera: Melolonthidae). *Revista Chapingo. Serie horticultura*, *18*: 383-394. https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2012.08.040.

San-Blas, E., Gowen, S.R., Pembroke, B., 2008. Scavenging or infection? Possible host choosing by entomopathogenic nematodes. *Nematology* 10, 251–259.

Sen-Selvan, J., Campbell, F. y Gaugler, R. 1993. Density-Dependent Effects on Entomopathogenic Nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae) within an Insect Host. *J. Invertebr. Pathol*. 62, 278-284. https://doi.org/10.1006/jipa.1993.1113.

Sergeant, M., Jarrett, P., Ousley, M., Morgan, J. (2003). Interactions of Insecticidal Toxin Gene Products from *Xenorhabdus nematophilus* PMFI296. *Appl. Environ. microbiol*, 69. https://doi.org/10.1128/AEM.69.6.3344-3349.2003.

Shapiro-Ilan, D.I., Morales-Ramos, J.A. y Rojas, M.G. 2016. In Vivo Production of Entomopathogenic Nematodes. In: Glare, T. y Moran-Diez M. (ed)

Microbial-Based Biopesticides. *Methods Mol. Biol*. vol 1477. Humana Press, New York, NY.

Shapiro-Ilan, D.I., Hiltpold, I. y Lewis, E.E. 2018. Nematodes. In: Hajek, A.E. and Shapiro-Ilan, D.I. (Ed.), *Ecol. Invertebr. Dis*. Wiley, Oxford, pp. 415–468.

Sharkey, M.J., Janzen, D.H., Hallwachs, W., Chapman, E.G., Smith, M.A., Dapkey, T., Brown, A., Ratnasingham, S., Naik, S., Manjunath, R., Perez, K., Milton, M., Hebert, P., Shaw, S.R., Kittel, R.N., Solis, M.A., Metz, M.A., Goldstein, P.Z., Brown, J.W., Quicke, D.L.J., Van - Achterberg, C., Brown, B.V. y Burns, J.M. 2021a. Minimalist revision and description of 403 new species in 11 subfamilies of Costa Rican braconid parasitoid wasps, including host records for 219 species. *ZooKeys* 1013: 1–665. https://doi.org/10.3897/zookeys.1013.55600

Sharma, H., Rana, A., Bhat, A., Chaubey, A. 2021. Entomopathogenic Nematodes: Their Characterization, Bio-Control Properties and New Perspectives. 10.5772/intechopen.99319.

Silva, B., Almeida, A.M, Dolinski, C., Souza, R.M. 2019. Efficacy of *Heterorhabdits indica* LPP35 against *Aedes aegypti* in domiciliary oviposition sites. *J. Nematol.* 51:1-7. https://doi.org/10.21307/jofnem-2019-050.

Sosa-Cabrera, T.J. y Santos Pérez, M. 2008. Caracterización clínica y de laboratorio de un brote de dengue en un área rural de Campeche, México. *Rev. Cubana de Med. Trop.* 60:136-40.

Spiridonov, S.E., Hominick, W.M. y Brisco, B.R. 1999. Morphology of amoeboid cells in the uterus of *Steinernema* species (Rhabditida: Steinernematidae). *Russ. J. Nematol.* 7:39-42.

Stamatakis, A., 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*. 22, 2688-2690. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl446.

Stock, S.P., Rivera-Orduño, B. y Flores-Lara, Y. 2009. *Heterorhabditis sonorensis* n. sp. (Nematoda: Heterorhabditidae), a natural pathogen of the seasonal cicada *Diceroprocta ornea* (Walker) (Homoptera: Cicadidae) in the Sonoran desert. *J. Invertebr. Pathol.* 100, 175-184. https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.11.011.

Strauch, O., Stoessel, S. y Ehlers, R. U. 1994. Culture conditions define automictic or amphimictic reproduction in entomopathogenic rhabditid nematodes of the genus *Heterorhabditis*. *Fundam. Appl. Nematol. 17*(6), 575-582.

Strauch, O. y Ehlers, R. U. 1998. Food signal production of Photorhabdus luminescens inducing the recovery of entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis* spp. in liquid culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50, 369-374.

Stuart, R.J., Barbercheck, M.E. y Grewal, P.S. 2015. Entomopathogenic nematodes in the soil environment: distributions, interactions and the influence of biotic and abiotic factors. In: Campos-Herrera, R. (Ed.), Nematode Pathogenesis of Insects and Other Pests: Ecology and Applied Technologies for Sustainable Plant and Crop Protection. Springer International Publishing, AG Switzerland, pp. 97–137. https://doi.org/ 10.1007/978-3-319-18266-7_4.

Subbotin, S.A. y Moens, M. 2006. Molecular taxonomy and phylogeny. In: Plant nematology (Perry RN, Moens M. eds.). Wallingford, UK, CABI Publishing. pp. 33-58.

Subkrasae C, Ardpairin J, Dumidae A, Janthu P, Meesil W, Muangpat P, Tandhavanant S, Thanwisai A, Vitta A. 2022. Molecular identification and phylogeny of *Steinernema* and *Heterorhabditis* nematodes and their efficacy in controlling the larvae of Aedes aegypti, a major vector of the dengue virus. *Acta Trop*. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106318.

Sunanda, B. S., Siddiqui, A. U. y Sharma, S. 2012. Effect of Temperature on Longevity of Entomopathogenic Nematodes, *Steinernema abbasi* and *Heterorhabditis indica*. *Indian J. Nematol,* 42.

Tailliez, P., Pages, S., Ginibre, N. y Boemare, N. 2006. New insight into diversity in the genus *Xenorhabdus*, including the description of ten novel species. I*nt. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 2805–2818.

Tailliez, P., Laroui, C., Ginibre, N., Paule, A., Pages, S. y Boemare, N. 2010. Phylogeny of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* based on universally conserved proteincoding sequences and implications for the taxonomy of these two genera. Proposal of new taxa. *X. vietnamensis* sp. nov., *P. luminescens* subsp. *caribbeanensis* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *hainanensis* subsp. nov., *P. temperata* subsp. *khanii* subsp. nov., *P. temperata* subsp. *tasmaniensis* subsp. nov., and the reclassification of *P. luminescens* subsp. *thracensis* as *P. temperata* subsp. *thracensis* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60:1921–1937.

Tailliez, P., Pages, S., Edgington, S., Tymo, L.M. y Buddie, A.G. 2012. Description of *Xenorhabdus magdalenensis* sp. nov., the symbiotic bacterium associated with *Steinernema australe*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62:1761–1765.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. y Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729. https://doi.org/10.1093/molbev/mst197.

Thomas, G.W. 1996. Soil pH and soil acidity, In: Sparks D.L. (Eds.), Methods of Soil Analysis: Part 3. Chemical Methods, Agronomy Monograph. American Society of Agronomy-Soil Science Society of America. Madison, Wisconsin. pp. 475-490. https://doi.org/10.2136/sssabookser5.3.c16.

Poinar, G., Thomas, G., 1967. The nature of Achromobacter nemato- philus as an insect pathogen*. J. Invertebr. Pathol*. 9, 510–514.

Thomas, G. M. y Poinar, G. O., Jr. 1979. *Xenorhabdus* gen. nov., a genus of entomopathogenic, nematophilic bacteria of the family Enterobacteriaceae. *Int.l J. Syst. Bacteriol.* 29:352–360.

Thompson, J.D., Higgins, D.G. y Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 22, 4673-4680. https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673.

Toksoz, S. y Saruhan, I. 2018. Efficacy of entomopathogenic nematode isolates from Turkey and Kyrgyzstan against the larvae of the mosquito species *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae) under laboratory conditions. *Egyptian J. Biol. Pest Control, 28*, 1-5.

Toledo, J., Pérez, C., Liedo, F.P. y Ibarra, J. 2005a. Susceptibility of larvae of *Anastrepha obliqua* Macquart (Diptera: Tephritidae) to *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar) (Rhabditida: Heterorhabditidae) in the laboratory. *Vedalia*, 12: 11-22.

Toledo, J., Ibarra, J. E., Liedo, P., Gómez, A., Rasgado, M.A. y Williams, T. 2005b. Infection of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) larvae by *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) under laboratory and field conditions. *Biocontrol Sci. Technol.* 15: 627-634.

Torres-Barragan, A., Suazo, A., Buhler, W. G. y Cardoza, Y. J. 2011. Studies on the entomopathogenicity and bacterial associates of the nematode *Oscheius carolinensis*. *Biol. Control*. 59: 123–129.

Treviño-Cueto, D., Subbotin, S. A. y Sanchez-Peña, S.R. 2021. Larvicidal activity of entomopathogenic nematodes isolated from Mexico against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Entomol Sci*, 56, 12–23. https://doi.org/10.18474/0749-8004-56.1.12.

Van Lenteren, J. y Bueno, V. 2003. Augmentative biological control of arthropods in Latin America. *BioControl*, 48: 123-139. https://doi.org/10.1023/A:1022645210394.

Vezzani, D. y Schweigmann, N. 2002. Suitability of containers from different sources as breeding sites of *Aedes aegypti* (L.) in a cemetery of Buenos Aires City, Argentina. *Memoiras do Instituto Oswaldo Cruz* 97: 789-792.

Wahengbam, J., Raut, A.M. y Mandal, S.K. 2018. Efficacy of new generation insecticides against *Trichogramma chilonis* Ishii and *Trichogramma pretiosum* Riley. Mortality. *J. entomol. Zool. Studies*. 6: 1361-1365.

Walsh, K. T., y Webster, J. M. (2003). Interaction of microbial populations in *Steinernema (*Steinernematidae, Nematoda) infected *Galleria mellonella* larvae. *J. Invertebr. Pathol. 83(2), 118–126.* https://doi.org/10.1016/s0022-2011(03)00079-x.

Wang, Y. y Gaugler, R. 1999. *Steinernema glaseri* surface coat protein suppresses the immune response of *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae. *Biol. Control*, 14: 45–50.

Welch, H.E. y Bronskill, J.F.1962.Parasitism of mosquito larvae by the nematode, DD136(Nematoda:Neoaplectanidae). *Can. J. Zool.* 40: 1263-1268. http://dx.doi.org/10.1139/z62-102.

Wollenberg, A.C., Jagdish, T., Slough, G., Hoinville, M.E., Wollenberg, M.S. 2016. Death becomes them: bacterial community dynamics and stilbene antibiotic production in cadaver of *Galleria mellonella* killed by *Heterorhabditis* and *Photorhabdus* spp. Appl. Environ. Microbiol. 82:5824-5837. https://doi.org/10.1371/journal.pone.019568.

Yeates G.W. 2003. Nematodes as soil indicator: functional and biodiversity aspects. *Biol. Fertil. Soils.* 37:199-210.

Yooyangket, T., Muangpat, P., Polseela, R., Tandhavanant, S., Thanwisai, A. y Vitta A. 2018. Identification of entomopathogenic nematodes and symbiotic bacteria from Nam Nao National Park in Thailand and larvicidal activity of symbiotic bacteria against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *PLoS ONE*, 13. https://doi.org/10.1371/journal.pone.019568.

Zepeda-Jazo, I., Molina-Ochoa, J., Lezama-Gutierrez, R., Skoda, S. R. y Foster, J. 2014. Survey of entomopathogenic nematodes from the families Steinernematidae and Heterorhabditidae (Nematoda: Rhabditida) in Colima, México. *Int. J. tropic. insect sci.* 34: 53−57.

Zhang, C., Liu, J., Sun, J., Yang, S., An, X. et al. 2008. Heterorhabditidoides chongmingensis gen. nov., sp. nov. (Rhabditida: Rhabditidae), a novel member of the entomopathogenic nematodes. *J. Invertebr. Pathol.* 98: 153-168. https://doi.org/ 10.1016/j.jip.2008.02.011.

Zhang, K., Baiocchi, T., Lu, D., Chang, D. y Dillman, A. 2019. Differentiating between scavengers and entomopathogenic nematodes: Which is *Oscheius chongmingensis*? *J. Invertebr. Pathol.* 167. https://doi.org/10.1016/jjip.2019.107245.

Zohdy, N.M., Shamseldean, E.A., El-Samiee y Hamama, H. M. 2013. Efficacy of the Steinernematid and Heterorhabditid Nematodes for Controlling the Mosquito, *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *J. Mosq. Res.* 3: 33-4

ANEXO

PeerJ

First record of entomopathogenic nematodes from Yucatán State, México and their infectivity capacity against *Aedes aegypti*

Mariana B. Ávila-López[1], José Q. García-Maldonado[1], Héctor Estrada-Medina[2], David I. Hernández-Mena[1], Daniel Cerqueda-García[1] and Víctor M. Vidal-Martínez[1]

[1] Aquatic Pathology Laboratory. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Mérida, Carretera Antigua a Progreso,, Mérida, Yucatán, México
[2] Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Departamento de Manejo y Conservación de Recursos Naturales Tropicales, Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México

ABSTRACT

Background: Biological control using entomopathogenic nematodes (EPN) has demonstrated good potential to contribute to the integral control of mosquito larvae, which as adults are vectors of diseases such as Dengue fever, Zika and Chikungunya. However, until now there are no records of the presence of EPN or their killing capacity in Yucatán state, southern México. The objectives of the current study were: (1) to report the entomopathogenic nematodes present in Yucatán soils and (2) to determine the killing capacity of the most frequent and abundant EPN against *Aedes aegypti* mosquito larvae and the microbial community developed by *Ae. Aegypti* exposed to this EPN.

Methods: The nematodes were collected by the insect trap technique using the great wax moth *Galleria mellonella*. Internal transcribed spacer (ITS), 28S gene of ribosomal DNA and phylogenetic analyses were performed to identify the EPN. For the bioassay, four concentrations of the most frequent and abundant EPN were tested: 1,260:1 infective juveniles (IJs) per mosquito larvae, 2,520 IJs:1, 3,780 IJs:1 and 5,040 IJs:1. High-throughput sequencing of the 16S rRNA gene was used to identify bacterial amplicon sequences in the mosquito larvae infected with EPN.

Results: Six isolates of *Heterorhabditis* were recovered from 144 soil samples. *Heterorhabditis indica* (four isolates) was the most frequent and abundant EPN, followed by *Heterorhabditis* n. sp. (two isolates). Both nematodes are reported for the first time for Yucatán state, Mexico. The concentration of 2,520 IJs:1 produced 80% of mosquito larvae mortality in 48 h. Representative members of *Photorhabdus* genus were numerically dominant (74%) in mosquito larvae infected by *H. indica*. It is most likely that these bacteria produce secondary toxic metabolites that enhance the mortality of these mosquito larvae.

Submitted 19 March 2021
Accepted 27 May 2021
Published 2 July 2021

Corresponding authors
Mariana B. Ávila-López, marianab.avila@cinvestav.mx
Víctor M. Vidal-Martínez, vvidal@cinvestav.mx

Academic editor
Joseph Gillespie

Additional Information and Declarations can be found on page 15

DOI **10.7717/peerj.11633**

Copyright
2021 Ávila-López et al.

Distributed under
Creative Commons CC-BY 4.0

OPEN ACCESS

Subjects Entomology, Molecular Biology, Parasitology
Keywords *Aedes aegypti*, Biological control, *Galleria mellonella*, *Heterorhabditis indica*, *Photorhabdus*, 16S rRNA

How to cite this article Ávila-López MB, García-Maldonado JQ, Estrada-Medina H, Hernández-Mena DI, Cerqueda-García D, Vidal-Martínez VM. 2021. First record of entomopathogenic nematodes from Yucatán State, México and their infectivity capacity against *Aedes aegypti*. **PeerJ 9:e11633 DOI 10.7717/peerj.11633**

INTRODUCTION

Biological control using entomopathogenic nematodes (EPN) has demonstrated good potential to contribute to the integral control of pests of agricultural and medical importance (*Chitra, Sujatha & Alagarmalai, 2017*). In the case of nematodes of the families Steinernematidae and Heterorhabditidae, their killing capacity is based on their symbiotic relationship with bacteria of the genera *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*, as well as on their capacity to infect insect hosts. During the EPN life cycle, the infective juvenile (IJs) enters the host's body through natural openings such as mouth, anus and spiracles. *Steinernema* can even penetrate the insect's integument (*Peters, 1994*; *Peters & Ehlers, 1997*). In the case of *Heterorhabditis*, this is done with the help of a cuticule projection resembling a tooth. Some authors even speak about a dorsal tooth (e.g., *Nguyen et al., 2004*). Once inside the host, the IJs migrate to the hemocoel where they release their symbiont bacteria (*Bedding, Akhurst & Kaya, 1993*). The bacterial community produces secondary metabolites with cytotoxic, antimicrobial, antiparasitic and insecticide activity, causing septicaemia in a period of 24 to 48 h after infection (*Bode, 2009*). These nematodes feed on the host tissues and reproduce for two or three generations, depending on the availability of food resources and the size of the host (*San-Blas, Gowen & Pembroke, 2008*). Then, the free-living stage IJs migrate, looking for another insect host to parasitise (*Akhurst, 1993*).

The monoxenic relationships between *Steinernema-Xenorhabdus* and *Heterorhabditis-Photorhabdus* have been frequently tested (*Eivazian, Mohammadi & Girling, 2017*), although bacteria such as *Providencia* sp., *Ochrobactrum* sp., *Pseudomonas* sp., and *Alcaligenes faecalis* have also been isolated from EPNs, without a clear understanding of their role in such interactions (*Jackson et al., 1995*; *Babic et al., 2000*; *Gouge & Snyder, 2006*). In insects, most microbiota studies have been based on the intestinal bacterial or haemolymph composition of infected insects (*Engel & Moran, 2013*). Indeed, diaxenic associations of non-canonical bacteria such as *Pseudomonas aeruginosa* have been found in the IJs of different generations of *H. indica*, favouring the infection of hosts such as *Galleria mellonella*, *Tenebrio molitor*, *Heliothis subflexa*, and *Diatraea magnifactella* when were combined with *Photorhabdus luminescens* (*Salgado-Morales et al., 2019*).

During the last few years, several studies have focused on the isolation of native EPN as biological control tools to fight against mosquitoes that may transmit important human diseases, such as dengue, Zika, Chikungunya and yellow fever (*Kovendan et al., 2018*). Recently, *Dilipkumar et al. (2019)* isolated *Steinernema siamkayai*, *Heterorhabditis indica*, *Steinernema glaseri* and *Steinernema abbasi* and evaluated their biocontrol potential against *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus* larvae. In the same way, in Thailand, *Yooyangket et al. (2018)* evaluated larvicidal activity of symbiotic bacteria belonging to EPN against *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* larvae. In Mexico, there are very few reports of native EPNs. For example, *Girón et al. (2012)* isolated *Heterorhabditis mexicana*, *Steinernema carpocapsae* and *Steinernema feltiae* from of Oaxaca soils.

In Sonora, *Stock, Rivera-Orduño & Flores-Lara (2009)* isolated *Heterorhabditis sonorensis* (currently, *Heterorhabditis taysearae*; *Dhakal et al., 2020*) in nymph corpses of *Diceroprocta ornea* (Homoptera: Cicadidiae) in asparagus crops. Most of the EPN isolated in Mexico have been tested for the biological control of pests of agricultural importance (*Stock, Rivera-Orduño & Flores-Lara, 2009*; *Salgado-Morales et al., 2019*).

Mexico also has a very important problem with the insidious capacity of *Ae. aegypti* for transmitting viral diseases such as dengue fever, with 268,458 cases in 2019 (https://www.paho.org/data/index.php/en/mnu-topics/indicadores-dengue-en/dengue-nacional-en/252-dengue-pais-ano-en.html?). The official actions to control the vector spread have been the elimination of breeding grounds and the use organophosphate and organochlorine pesticides. However, an important drawback of these compounds is that they cause alterations to the nervous, immunological, respiratory, endocrine and reproductive systems of humans, not to mention resistance and persistence related to the environment (*Blair et al., 2014*). In rural and urban zones, the use of such pesticides represents the main cause of groundwater pollution (*Olvera et al., 2008*). *Polanco et al. (2015)* reported on the presence of organochlorine pesticides like DDT at a concentration of 16 ppb in the aquifer of the Yucatán state, Cenotes Ring. Because of this, it is extremely important to look for other environmentally friendly alternatives to control the *Ae. aegypti* vector life cycle and one of these alternatives are the EPNs.

Our quest for EPN in the Yucatán revealed the presence of two species. Since EPNs are pathogenic to insects, we hypothesise that the most frequent and abundant species (*H. indica*) should be able to produce high mortality (>70%) in *Ae. aegypti* mosquito larvae. Under this context, the purpose of the current study was two-fold: (1) to report for the first time the presence of two species of entomopathogenic nematodes from Yucatán state soils, and (2) to determine the killing capacity and microbial community present in *H. indica* against *Ae. aegypti* mosquito larvae.

MATERIALS & METHODS

During September and October 2018 (rainy season), soil samples were collected from 12 different locations of Yucatán state appertaining to the municipalities of Peto, Cantamayec, Tikuch, Cansahcab, Dzan, Sucila, Maxcanu, Opichen, Muna, Oxkutzcab, Tunkas and Chikindzonot (Fig. 1). Soil samples were collected from different cultivations of sour orange (*Citrus aurantium*) and sweet orange (*Citrus sinensis*). To obtain the EPN, four composite soil samples per location were used; these samples were placed in plastic containers (1 kg per flask) for a total of 144 samples. Each flask was punched in the bottom and before taking the sample from each flask, 15 cm were excavated using a small blade (*Thanwisai et al., 2012*). At the end of the collection, the soil samples were placed in foam coolers for transportation to the Aquatic Pathology Laboratory of the Centre for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute (Mérida Unit). *Galleria mellonella* cultured in the laboratory were used as insect traps for the EPN isolation (*Bedding & Akhurst, 1975*). Four *G. mellonella* larvae per flask were used and

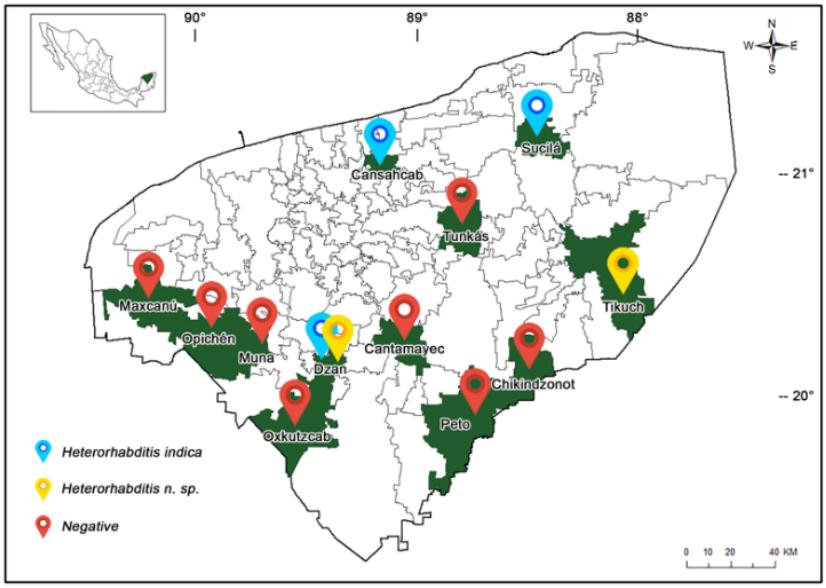

Figure 1 Map of Yucatán state showing the sites sampled for entomopathogenic nematodes. Sampling sites marked with red denote absence of EPNs, while sampling sites marked with blue and yellow were positive for EPNs. Full-size DOI: 10.7717/peerj.11633/fig-1

placed at room temperature for five days. The infected *G. mellonella* were placed in wet chambers until the IJ emergence, following the procedure suggested by *Kaya & Stock (1997)*.

Soil analysis

A soil composite sample (four subsamples of 250 g per site) was separated, weighed and labelled for physico-chemical analysis. The samples were processed at the Soil, Plant and Water Analysis Laboratory at the Universidad Autónoma de Yucatán (UADY), following a standard measurement procedure: particle size with densimeter (*Gee & Bauder, 1986*); redox and pH through a potentiometer (*Patrick, Gambrell & Faulkner, 1996*; *Thomas, 1996*); phosphorous by the Olsen method (*Kuo, 1996*); organic matter by colorimetric determination (*Nelson & Sommers, 1996*) and electric conductivity through potentiometry (*Rhoades, 1996*). Student's *t*-test was used to determinate differences of physico-chemical characteristics between EPN positive and EPN negative soil samples ($p \leq 0.05$).

Polymerase chain reaction and sequencing of EPNs

For DNA extraction, two adult nematodes were cut into small pieces using a sterile scalpel to reduce cell lysis time according to the protocol of the DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen™). The ITS region and the 28S gene of ribosomal DNA were amplified by the polymerase chain reaction (PCR). For the PCR mix in each tube we added the follow: 12.5 µl of Green GoTaq Master Mix (Promega, Madison, WI, USA), one µl of each primer

(10 µm), 8.5 µl of distilled water and two µl of genomic DNA for a final volume of 25 µl. The primers used in this study for ITS were the forward TW81 5-GTTTCCGTAGGTG AACCTGC-3, plus the reverse AB28 5-ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3 (*Nthenga et al., 2014*). For the 28S rRNA gene, the primers used were 391F 5′-AGCGGAGGAAAAG AAACTAA-3′ (*Nadler & Hudspeth, 1998*) and 536R 5′-CAGCTATCCTGAGGG AAAC-3′ (*García-Varela & Nadler, 2005*). All PCR reactions were run in an Axygen® MaxyGene™ II thermocycler. For ITS, the following amplification conditions were used: one cycle of pre-denaturation at 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles of denaturation at 92 °C for 30 s, annealing at 47 °C for 45 s, extension at 72 °C for 90 s and finally an extension at 72 °C for 10 min. Subsequently, the following amplification conditions were used for the 28S PCR: one cycle of pre-denaturation at 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94 °C, annealing at 50 °C, and extension at 72 °C for 1 min each temperature and, then a final extension at 72 °C for 10 min. PCR products were verified by electrophoresis on a 1% agarose gel using 1X TAE buffer at 90 V for 45 min in a BioRad Sub-Cell®GT agarose gel electrophoresis system using a Promega® DNA leader of 1 KB molecular weight as a reference. The PCR products were visualised in a BioDoc-It® Imager. PCR products were commercially sequenced by GENEWIZ (South Plainfield, NJ, USA). Subsequently, the consensus sequences of ITS and 28S were aligned with the sequences obtained for each primer using Geneious Pro 4.8.4® (Biomatters Ltd., Auckland, New Zealand). The consensus sequences of each nematode were deposited in the GenBank database with accession numbers MW729401 to MW729412 (Fig. 2).

Phylogenetic analysis of EPNs

For the identification of the EPN that in both cases belonged to the genus *Heterorhabditis*, the consensus sequences of ITS and 28S rRNA gene of our specimens were subjected to BLAST (*Altschul et al., 1990*) alignment against the nucleotide database at National Centre for Biotechnology Information (NCBI). Subsequently, the sequences generated in this study were aligned with sequences available in GenBank belonging to other species of *Heterorhabditis*. Two datasets were generated, one for ITS and another for 28S. *Heterorhabditidoides* was used as outgroup. The alignment of each data set was performed with ClustalW (*Thompson, Higgins & Gibson, 1994*), implemented in the website http://www.genome.jp/tools/clustalw/, with the approach 'SLOW/ACCURATE' and weight matrix 'CLUSTALW (FOR DNA)'. The extremes of the alignment were trimmed to match the length of our sequences. The nucleotide substitution model was estimated with the program jModelTest v2 (*Darriba et al., 2012*). Phylogenetic analysis was run under Maximum Likelihood (ML) with RAxML v. 7.0.4 (*Stamatakis, 2006*). A first phylogenetic analysis was performed with Raxml to discard sequences of GenBank that may have problems of taxonomic identification in each data set. Then, a second phylogenetic analysis was performed with 10 replicates and 1,000 bootstrap repetitions to obtain the best phylogenetic hypothesis of the ITS and 28S datasets. The ML trees were visualised in FigTree v.1.4.3. (*Rambaut, 2016*). Molecular variation of 28S data sets was estimated using uncorrected p distances (p-distances) with the software MEGA v.6 (*Tamura et al., 2013*).

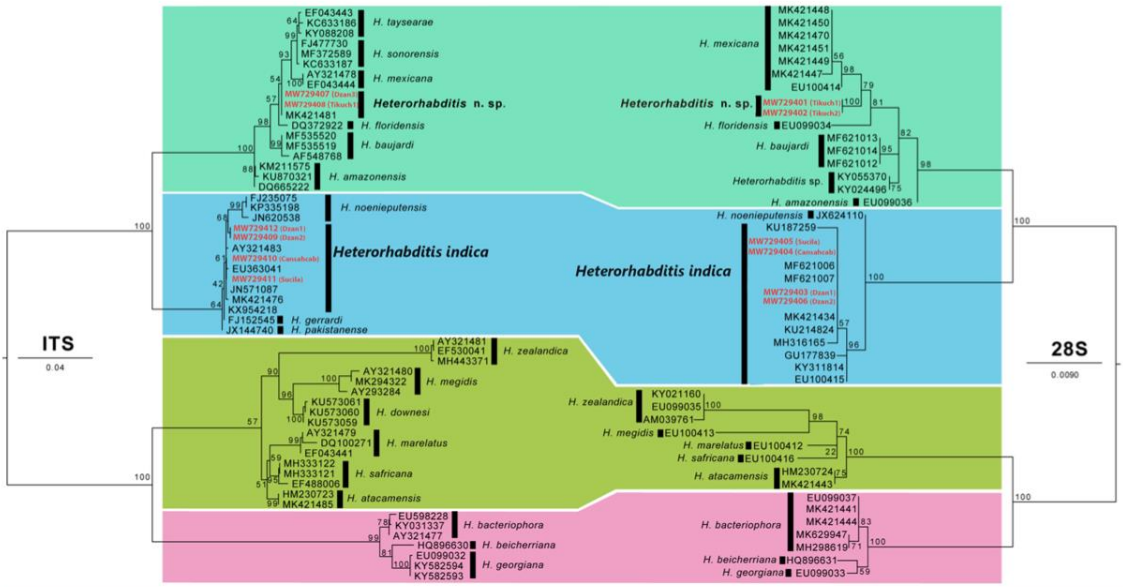

Figure 2 Phylogenetic relationships of species of the genus *Heterorhabditis* using the maximum likelihood method to generate the phylogenetic trees. The tree obtained with ITS is shown on the left side and the resulting tree with 28S is shown on the right side. The newly generated sequences are highlighted in red. Numbers near the tree nodes represent the bootstrap support values and the scale bar indicates the number of substitutions per site.
Full-size DOI: 10.7717/peerj.11633/fig-2

Experimental infection

For the assays we used the most frequent and abundant entomopathogenic nematode species recovered from the *G. mellonella* infections, i.e., *H. indica*. We used flasks with a capacity of 1.9 l with 400 ml of bubbled tap water, and the following procedure. Four concentrations of nematodes were used: 1:1,260 mosquito larvae/infective juveniles (l/[IJs]), 1: 2,520 l/IJs, 1: 3,780 l/IJs, 1: 5,040 l/IJs and a control per concentration (mosquito larvae without nematodes) with each concentration replicated four times. Each treatment and control flask contained ten *Ae. aegypti* larvae in the fourth stage. The experimental infection was replicated two times, with very similar results (Fig. S1 presents mosquito larvae survival in the first experiment). Consequently, we only present the outcomes of the last experimental infection. The *Ae. aegypti* eggs were raised in the Laboratory of Aquatic Pathology of the Centre for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute from eggs kindly donated by Centre for Research Dr. Hideyo Noguchi. The mosquito larvae mortalities were monitored every 4 h until 48 h post-exposure (time allowed before the transformation of larvae into pupae). Dead mosquito larvae (those without movement when touched with a fine painting brush) were washed (three times) with distilled water and fixed in DNA/RNA Shield.

The survival of *Ae. aegypti* larvae was estimated through a survival analysis (Kaplan–Meier Estimate). This analysis is a nonparametric statistical method to estimate

the probability of the mosquito larvae survival after infection with *H. indica* through time. To determine the dosage at which *H. indica* caused 50% of mortality in *Ae. aegypti* larvae, a probit analysis was conducted following *Finney (1971)* procedure. The software used for survival and probit analysis was MedCalc® (MedCalc Software Ltd., Ostend, Belgium).

Bacterial detection by 16S rRNA sequencing

In order to get a broad comparison of the bacterial composition from infected and non-infected *Ae. aegypti* larvae, genomic DNA was extracted from a pool of three larvae for each type of samples (infected and non-infected) with the DNAeasy blood and tissue extraction kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). DNA quality was verified by agarose gel (1%) electrophoresis. PCR Amplification of hypervariable V3 and V4 regions of 16S rRNA, library preparation and Illumina sequencing were performed as previously described in *Valencia-Agami et al. (2019)*. Bioinformatic processing were done with the QIIME2 (2019) pipeline (*Caporaso et al., 2010*). The error correction, denoising and ASVs taxonomical assignation were performed as previously reported in *Cadena et al. (2019)*.

RESULTS

From the 12 collection sites in the Yucatán state, four sites were positive for EPNs (Cansahcab, Sucila, Ticuch and Dzan). From the 144 soil samples, six isolates were positive for Heterorhabditidae (4.16%). Most of the nematodes were isolated from Dzan, Yucatán. Based on the nucleotide sequence analysis of 28S and ITS, we concluded that four isolates belonged to the species *Heterorhabditis indica* and two isolates were identified as *Heterorhabditis* n. sp.

Molecular identification and phylogenetic analysis of *Heterorhabditis*

The comparison of nucleotide sequences with the sequences published in GenBank through BLAST allowed us to molecularly identify our EPN from Yucatán state, where some of our specimens had a high percentage of similarity with *H. indica* (99.73–100% in ITS and 99.89–100% in 28S). With respect to the phylogenetic analysis, the final ITS data set consisted of 57 sequences representing 17 species, and the alignment had a length of 1,092 bp. The substitution model selected for this data set was GTR+I. Nucleotide frequencies were A = 0.254, C = 0.203, G = 0.255 and T = 0.288. The ML value of the tree was −ln = 4,451.710121. The phylogenetic tree obtained with the ITS data set showed that the new sequences of this study were grouped into two clades, one corresponding to *H. indica* and another one that belongs to an unidentified species: *Heterorhabditis* n. sp. (Fig. 2). In Dzan, Yucatán the two species *H. indica* and *Heterorhabditis* n. sp. were present, while only *Heterorhabditis* n. sp. was found in Tikuch. In the phylogenetic tree, *Heterorhabditis* n. sp. was phylogenetically closest to the clade formed by *Heterorhabditis taysearae* + *Heterorhabditis mexicana* (Fig. 2), with an interspecific genetic distance of 1.31% (10 nucleotides) with both species and there was no intraspecific variation between the specimens of *Heterorhabditis* n. sp. All sequences identified as *H. indica* were

grouped with other sequenced *H. indica* specimens, in a clade that also contained to *H. noenieputensis* (Fig. 2). The genetic distance between *H. indica* and *H. noenieputensis* was 1 to 1.2% (7 to 9 nucleotides). The intraspecific genetic distance of *H. indica* was from 0 up to 0.4%. For the 28S gene, the data set consisted of 45 sequences representing 16 species, with a length of 934 bp. The substitution model selected was GTR+G+I. Nucleotide frequencies were A = 0.260, C = 0.193, G = 0.295 and T = 0.252. The ML value of the tree was –ln = 2,146.711150. The phylogenetic relationships of both *Heterorhabditis* species with the 28S gene were practically the same as those obtained with the ITS. As in ITS, the specimens sequenced in this study were grouped into two independent clades. The nematodes from Tikuch were separated as *Heterorhabditis* n. sp. and the genetic distance between the *Heterorhabditis* n. sp. and *H. mexicana* specimens was 0.5% to 0.7% (4 to 6 nucleotides) with no intraspecific differences between the *Heterorhabditis* n. sp. On the other hand, the nematodes from Cansahcab, Dzan and Sucila were grouped as *H. indica*, with an interspecific genetic distance of 0.3% (3 nucleotides) with *H. noenieputensis*. The intraspecific genetic distance of the *H. indica* was up to 0.2% (2 nucleotides).

Soil analysis

H. indica and *Heterorhabditis* n. sp. were found in soils used for agriculture and cattle farming. The characteristics of the soil of the localities where these EPN were and were not found are presented in Table 1. Apparently, the relevant characteristics for the presence of these EPN in soil were chemical variables such as potassium and calcium (See Table 2). Significant differences in variables such as P (mg/kg), %OM and soil type were not found between EPN positive and EPN negative samples ($P > 0.05$).

Experimental infection

The percentage of survival values of *Ae. aegypti* mosquito larvae exposed to *H. indica* are shown in Fig. 3. The mean survival values of the mosquito larvae exposed to *H. indica* and their 95% confidence intervals are shown in Table 3. There was a significant difference in survival when comparing the average mortality of *Ae. aegypti* larvae between the various nematode concentrations and the control (Kaplan–Meier estimate, *P*-value = 0.0279). Figure 3 showed that the highest mortality (80%) in *Ae. aegypti* larvae was achieved using 1:2,520 l/IJs and 1:3,780 l/IJs after 46 h. The lowest mortality obtained was at 24% for the concentration with the highest number of nematodes (1:5,040 l/IJ). The lethal dose (LD50) was estimated at different exposure times (Table 4). The LD50 of *H. indica* at 24 hr was of 7,040 infective juveniles, with a confidence interval of 95% from 5,802 to 8,277 infective juveniles.

Bacterial composition of *Ae. aegypti* larvae

Bioinformatic analyses of the 16S rRNA sequences indicated that the pool of mosquito larvae infected by *H. indica* was composed by twenty ASVs corresponding to 9 families and 12 genera (Fig. 4). In which, at a lower taxonomic level, *Photorhabdus* was the

Table 1 Mean of the measured soil parameters with the presence and absence of EPNs from Yucatán state.

Genus/species	Locality	Geographic coordinates	Soil type	Organic matter (%)	pH	Land use	Potassium (Cmol (+)/kg)	Calcium (Cmol (+)/kg)	Phosphorus (mg/kg)
H. indica	Cansahcab	21°9′16.02″ N 89°5′26.36″ O	Sandy clay loam	12.7	8.0	Cattle farm	1.5	53.8	133.6
H. indica	Sucila	21°8′58.98″ N 88°18′22.04″ O	Sandy clay loam	7.5	7.9	Cattle farm	2.3	24.6	89.9
H. indica/ *Heterorhabditis* n. sp.	Dzan	20°22′36.1″ N 89°27′2.6″ O	Sandy clay loam	5.1	7.8	Field crop	14.7	80.2	1.6
Heterorhabditis n. sp.	Ticuch	20°42′5.82″ N 88°6′39.07″ O	Sandy loam	8.5	7.2	Cattle farm	0.3	17.0	0.02
Without EPNs	Maxcanu	20°35′34.31″ N 89°59′15.91″ O	Sandy loam	9.6	7.5	Industrial	2.5	43.3	58.6
Without EPNs	Opichen	20°33′17.34″ N 81°51′51.50″	Sandy loam	9.1	7.8	Forestry	3.0	46.0	801.1
Without EPNs	Muna	20°29′16.34″ N 89°43′36.18″ O	Sandy loam	12.4	7.4	Industrial	2.2	37.8	4.1
Without EPNs	Oxkutzcab	20°19′1.00″ N 89°25′52.79″ O	Clay	4.8	7.4	Citric crop	1.5	15.6	38.2
Without EPNs	Tunkas	20°54′5.45″ N 88°44′41.77″O	Sandy loam	9.5	7.8	Field crop	1.5	52.4	2430.5
Without EPNs	Chikindzonot	20°19′39.40″ N 88°29′23.66″ O	Clay	5.7	7.9	Forestry	2.3	30.2	0.3
Without EPNs	Peto	20°06′25.4″ N 88°52′45.6″ O	Clay	8.1	7.6	Forestry	1.7	33.4	2.2
Without EPNs	Cantamayec	20°28′38.40″ N 89°4′43.62″ O	Sandy loam	0.8	7.7	Field crop	0.5	26.1	1.3

Table 2 Mean difference between EPN positive and EPN negative soil samples parameters.

Parameter	Group 1	Group 2	N1	N2	Mean (1)	Mean (2)	Mean (1)–Mean (2)	T	*P* value
Phosphorus (mg/kg)	EPNs	Without EPNs	16	40	70.37	417.07	−346.70	−1.95	0.0575
Organic matter (%)	EPNs	Without EPNs	16	40	8.48	7.55	0.93	0.87	0.3906
Sand (%)	EPNs	Without EPNs	16	40	45.99	42.29	3.70	0.70	0.4889
Silt (%)	EPNs	Without EPNs	16	40	15.63	16.45	−0.82	−0.41	0.6830
Clay (%)	EPNs	Without EPNs	16	40	38.39	41.26	−2.88	−0.56	0.5752
Potassium (Cmol(+)/kg)	EPNs	Without EPNs	16	40	5.86	1.94	3.92	2.50	0.0247
pH	EPNs	Without EPNs	16	40	7.88	7.69	0.19	2.43	0.0183
Calcium (Cmol(+)/kg)	EPNs	Without EPNs	16	40	50.64	35.65	14.99	2.29	0.0337

dominant genus in the sample (74.2%). However, *Elizabethkingia* (10.4%), *Pseudomonas* (4.1%), *Delftia* (2.7%), *Achromobacter* (1.9%) *Phreatobacter* (1.6%) and other less abundant (<1%) genera were also detected (Fig. 4). In contrast, the pool of non- infected

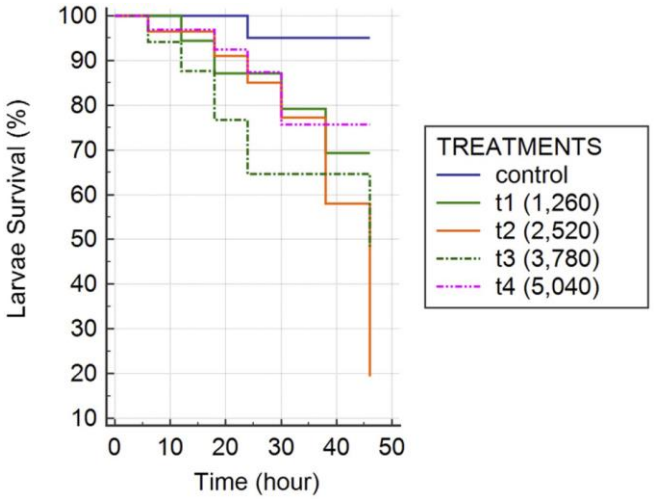

Figure 3 **Kaplan-Meier overall survival curves comparing the mortality of *Aedes aegypti* larvae after exposure to infective juveniles of *Heterorhabditis indica*.** Control contained no infective juveniles. The treatments units were the number of infective juveniles of *H. indica* per mosquito larvae. Each treatment had 10 mosquito larvae. Full-size DOI: 10.7717/peerj.11633/fig-3

Table 3 **Percentage survival values of *Aedes aegypti* mosquito larvae exposed to entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis indica*.**

Factor	Mean	SE	95% CI for the mean
Control (no nematodes)	44.900	1.072	[42.799–47.001]
T1 (1:1,260 l/IJs)	40.016	2.757	[34.612–45.420]
T2 (1: 2,520 l/IJs)	38.954	2.640	[33.780–44.128]
T3 (1: 3,780 l/IJs)	35.710	2.814	[30.195–41.225]
T4 (1: 5,040 l/IJs)	40.524	2.196	[36.219–44.829]

Note:
The acronyms were as follows: SE, standard error; 95% CI for the mean, 95% confidence intervals (CI) for control and treatments (T1–T4); l/IJs, mosquito larvae/infective juveniles.

Table 4 **Fifty percent lethal dose values (LD50) for *H. indica* against mosquito larvae third stage at different exposure times.**

Exposure time (h)	LD50 (IJs/mosquito larvae)	95% Confidence limits
12	14,997	[11.545–19.481]
24	7,040	[5.802–8.277]
48	6,324	[5.189–7.458]

mosquito larvae (control), exhibited 19 ASVs from 13 families and 14 genera (Fig. 4). *Delftia* (22.61%), *Chryseobacterium* (18.19%), *Brevundimonas* (15.06%) and *Flavobacterium* (11.34%) were the most abundant genera (Fig. 4).

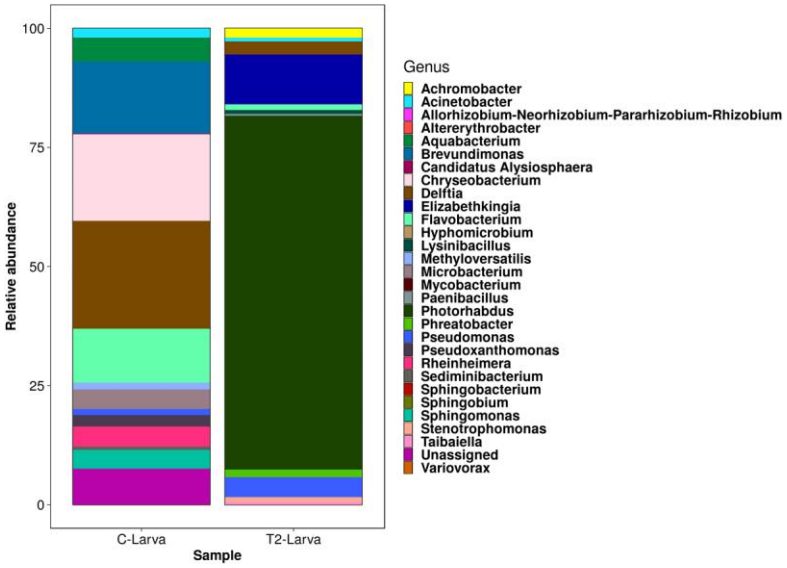

Figure 4 Relative abundance of bacteria in the larvae of *Aedes aegypti* infected with *Heterorhabditis indica*. The colours represent the bacterial diversity of the genera present in the mosquito larvae. Acronyms were as follows: C-Larva: mosquito larvae from the control treatment without nematodes; T2-Larva: mosquito larvae from treatment two (2,520 infective juveniles of *Heterorhabditis indica* per mosquito larva). Full-size DOI: 10.7717/peerj.11633/fig-4

DISCUSSION

Heterorhabditis indica and *Heterorhabditis* n. sp., are reported for the first time in Yucatán state, México. The finding of these nematode species was corroborated by the ITS and 28S genes. Our original hypothesis that *H. indica* would be able to produce a high percentage of mortality (>70%) in *Ae. aegypti* mosquito larvae was supported. This was confirmed since *H. indica*, in association with its bacterial composition, was able to induce 80% mortality in *Ae. aegypti* larvae at the concentration of 2,520 IJs/I by 48 h post-infection. This is the first record of EPN present in Yucatán state soil, and the results obtained were promising in terms of the pathogenicity of this nematode and its potential as a biological control alternative.

Molecular identification and phylogenetic analysis of *H. indica* and *Heterorhabditis* n. sp.

The analysis of the nucleotide sequences and phylogenetic analysis of the 28S and ITS of the isolated nematodes of Dzan, Cansahcab and Sucila in this study allowed us to corroborate the taxonomic identification of two species of *Heterorhabditis*. In the case of *Heterorhabditis* n. sp., the phylogenetic analysis and genetic distances indicated that this nematode is a genetically different species from those sequenced and previously

described. The finding of *H. indica* in Yucatán state is not surprising since apparently is a species distributed worldwide (e.g., *Saleh et al., 2001*; *Dolinski et al., 2008*; *Bruno et al., 2020*). Phylogenetic analysis positioned *H. indica* from Yucatán state within the Indica group, named by *Andaló, Nguyen & Moino (2006)* (*Nguyen, Shapiro & Mbata, 2008*; *Malan, Knoetze & Tiedt, 2014*; *Dhakal et al., 2020*). All species of the Indica-group are found in the tropics and subtropics zones and this group is divided into two subclades: the Indica-subclade conformed of *H. indica* and *H. noenieputensis*, and the Baujardi-subclade with *H. baujardi*, *H. amazonensis*, *H. floridensis*, *H. mexicana* and *H. taysearae* (*Dhakal et al., 2020*). Particularly, the two EPN species of our study were phylogenetically associated with each of the previously described subclades. *Heterorhabditis* n. sp. from Dzan and Tikuch was grouped in the Baujardi-subclade, and there were no intraspecific differences between the specimens sequenced with both markers. The phylogenetic position of *Heterorhabditis* n. sp. makes sense geographically, because it was grouped with species that have been described in North America, such as *H. mexicana* and *H. floridensis* (*Nguyen et al., 2004*; *Nguyen, Mrek & Webster, 2006*).

Our study reports for the first time, the presence of *Heterorhabditis* n. sp. in the Yucatán state. It should also be noted that the sequences of the undescribed species are grouped with two sequences that were identified as *H. mexicana* in the GenBank; however, the phylogenetic analysis showed that this sequence does not correspond to the species described by *Nguyen et al. (2004)*.

Soil samples

The soil type (sand, silt, clay) did not seem to be as important as the physico-chemical composition of soil for the presence of EPN. The nematodes were present in soil with alkaline pH going from 7.2 to 8. It has been proved that the alkaline levels (10) or acid levels (5.6) reduce survival of EPN, in comparison to values closer to neutrality (*Plante et al., 2006*). This result coincides with those reported by *Rodríguez et al. (2009)* where it was observed that *Heterorhabditis* is present in soils with an alkaline pH compared to *Steinernema*.

The potassium concentration reported in soil samples in this study was 0.03 to 14.7 (Cmol(+)/kg) and 17 to 80.2 (Cmol(+)/kg) of calcium. *Alumai et al. (2006)* mentioned not finding an individual correlation between the presence of EPN and factors such as calcium, potassium and pH in turfgrass, but together contribute to the cation exchange capacity of the soil. Thus, apparently K and Ca could be the factors that influenced the presence and distribution of these EPNs in Yucatán State soil.

Despite of the fact that significant differences were not found between soil types, EPN were found in soils where agriculture and stockbreeding are carried out and were classified as sandy-clay soils. In addition, *Dolinski et al. (2008)* suggest that *H. indica*, together with other EPN typical of tropical regions, can be found in environments with a relative high percentage of sand.

Yooyangket et al. (2018) reported 13 isolates of *Heterorhabditis* and 14 isolates of the *Steinernema* in clay soils of the Nam Nao National Park, Thailand. Therefore, the difference between the Yucatán and Thai soils would be in the sand contents. Whether or

not this sand content is acting as a limiting factor for the survival of the Yucatán EPN should be tested experimentally. In the same way, it is important to extend this research to new sampling points in the Yucatán State probably without the influence of agriculture and stockbreeding to determine whether the poor EPN species richness detected is a regional pattern. This is important because other authors have noted that edaphic factors may dramatically influence the presence of EPN (*Lacey & Kaya, 2000*).

Experimental infection

Our results demonstrated that *Ae. aegypti* larvae were susceptible to *H. indica* (and their bacteria) recovered from Yucatán state at 2,520 nematodes per mosquito larvae (Fig. 3). It was expected that a higher number of nematodes would produce higher mortality. However, the 5,040:1 concentration reached only 25% mortality in mosquito larvae. A possible explanation for the poor performance of high concentrations of nematodes in producing mosquito larvae mortality is that of intraspecific competition by nutrients and space, which in turn reduced their infectivity and survival when the nematode concentration increases. This is a process that has been observed previously by *Sen-Selvan, Campbell & Gaugler (1993)*, who compared the effect of increasing *S. carpocapsae* and *H. bacteriophora* in *G. mellonella* larvae. The authors reported that when the number of nematodes per host increased, the percentage of penetration decreased. Certainly, our results suggest that the use of nematode concentrations as high as 5,040 IJs/I is not effective nor economically feasible. However, now that the most effective nematode concentration to produce mosquito larvae mortality has been established (2,520 IJs/I), the following task will be to decrease the number of IJs mantaining a similar mortality level.

In terms of mosquito larvae mortality, *Peschiutta, Cagnolo & Almirón (2014)* reported the susceptibility of *Ae. aegypti* to *H. bacteriophora*, obtaining 84% mortality at a concentration of 750 IJs per mosquito larvae. Our results contrast with those reported in *H. bacteriophora*, since a lower concentration of nematodes was enough to obtain high mortality in *Ae. aegypti*. We consider the results obtained here as promising since the Yucatán State strain of *H. indica* produced a high mortality level in normal tropical environmental conditions with regards to temperature (>29.6 °C; >85.3 °F), $CaCo_3$ (408 ppm) and pH (6.88) compared to those of *Peschiutta, Cagnolo & Almirón (2014)* developed in laboratory conditions at 26 °C. However, the percentage mortality reached with *H. indica* from Yucatán state was higher than that obtained by *Pandii et al. (2008)* who tested the infective capacity of *S. carpocapsae* and *H. indica* (Local Thai strain) in *Culex gelidus*, obtaining a mortality of 63% and 13%, respectively, at a concentration of 4,000 IJs per mosquito larvae. Clearly, additional bioassays exposing *Ae. aegypti* larvae to lower concentrations of *H. indica* from Yucatán state are necessary. Although in this work we did not evaluate the physiological responses of mosquito larvae to *H. indica* infection, it is known that EPN can cause mortality by suppressing the immune response of insects by reducing the number of haemocytes and phenoloxidase levels (*Lalitha et al., 2018*).

Differences in the bacterial composition of infected and non-infected *Ae. aegypti* larvae

16S rRNA sequences allowed a broad comparison of the bacterial composition of infected and non-infected *Ae. aegypti* larvae. Several differences were observed in the two type of samples. However, the main difference was that *Photorhabdus* was the dominant genus in the infected mosquito larvae, representing 74.2% of the total microbial composition. Thus, we suggest that the endosymbiotic *Photorhabdus* most likely transported by *H. indica*, was able to infect *Ae. aegypti* larvae; something that did not happen in the non-infected mosquito larvae. Moreover, *Elizabethkingia* was also found as part of the microbial community of *Ae. aegypti* larvae infected by EPN. *Boissière et al. (2012)* reported *Elizabethkingia* spp. in 68% *Anopheles gambiae* mosquito collected in Cameroon. It is very likely that some species of *Elizabethkingia* are symbionts of mosquitoes, since they have been found through the life cycle of *Ae. aegypti* (*Coon et al., 2014*).

Only four genera were shared between the control and infected mosquito larvae: *Acinetobacter, Flavobacterium*, *Delftia* and *Pseudomonas*. *Jiménez et al. (2016)* reported species of *Pseudomonas* and *Delftia*, which are part of the EPN microbiota in species such as *Rhabditis regina*, with the capacity of causing mortality in *Phyllophaga* sp., *Anomalla* sp. and *G. mellonella*. Another bacterial genus found in the microbiota of mosquito larvae infected by *H. indica* was *Achromobacter* which, despite presenting a relative low abundance (1.9%), apparently could be also pathogenic to insects. For example, *Poinar & Thomas (1966)* isolated *Achromobacter nematophilus* from the nematode *Neoplectana* sp. while demonstrating its pathogenicity in *Galleria mellonella* larvae.

By high throughput sequencing, it was possible identify bacterial genera with low relative abundance (<1.2%) such as *Flavobacter, Stenotrophomonas, Acinetobacter, Lysinibacillus, Taibaiella* and *Paenibacillus*. Some of these bacteria have been reported to have low pathogenicity to mosquito larvae, especially those of the genera *Lysinibacillus* and *Paenibacillus* (*Rojas-Pinzón & Dussán, 2017*). *Cambon et al. (2020)* mentioned that the host's 'normal' microbiota may be present in the host without causing damage, but under specific stress conditions such as infection with EPN, these opportunistic bacteria could manifest if the host immune system is suppressed. In the current study, the role these bacteria play during the infection process of the mosquito larvae or their interaction with the immune capacity of these larvae is unknown. For this reason, it would be pertinent to perform further experiments concerning the infections by *H. indica* bacterial symbionts and other bacteria considered as entomopathogenic, to formulate bacterial associations with greater pathogenic capacity. This is an interesting research avenue since it could provide us with new nematode-bacteria consortia acting on real environmental conditions against mosquito larvae.

In summary, our results suggest that the local strain of *H. indica* in association with their endosymbiotic bacteria have the infective capacity to induce 80% mortality in *Ae. aegypti* larvae. The high mortality of *Ae. aegypti* larvae apparently was related to bacteria of the genus *Photorhabdus*, since this was the numerically dominant endosymbiont compared to other non-symbiotic bacteria reported in this work. However, changes in the

structure of the microbial community of *Ae. aegypti* larvae were observed as a result of exposure with *H. indica*. Even when EPN and/or their symbiotic bacterial associations appear as very promising biocontrol tools to kill mosquito larvae, it is important to be very careful about the release of these organisms into the environment, even if they are native. This is especially important for a region such as Yucatán state where native (and introduced) bees are important insects related to the pollination of wild plants, and beekeeping is an important economic activity in the countryside. Therefore, further studies should be performed to determine the susceptibility of beneficial insects such as European bees and stingless bees such as *Melipona* to EPN and the toxins released by their symbiotic bacteria.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank to Dr. Jorge Eugenio Ibarra Rendón and Andrés Martínez Aquino by their assistance in the molecular identification, MSc José Sandoval and Biologist José Germán López Guerra for their help in field work, and the staff of the Aquatic Pathology Laboratory at CINVESTAV-Mérida for their help in laboratory work.

ADDITIONAL INFORMATION AND DECLARATIONS

Funding

Mariana B. Ávila-López benefited from a PhD student grant from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) of the Mexican Government (Scholarship No. 340012). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Grant Disclosures

The following grant information was disclosed by the authors:
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).
Mexican Government: 340012.

Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author Contributions

- Mariana B. Ávila-López conceived and designed the experiments, performed the experiments, analyzed the data, prepared figures and/or tables, and approved the final draft.
- José Q. García-Maldonado conceived and designed the experiments, authored or reviewed drafts of the paper, and approved the final draft.
- Héctor Estrada-Medina performed the experiments, authored or reviewed drafts of the paper, and approved the final draft.
- David I. Hernández-Mena analyzed the data, authored or reviewed drafts of the paper, and approved the final draft.

- Daniel Cerqueda-García analyzed the data, prepared figures and/or tables, and approved the final draft.
- Víctor M. Vidal-Martínez conceived and designed the experiments, authored or reviewed drafts of the paper, and approved the final draft.

DNA Deposition

The following information was supplied regarding the deposition of DNA sequences:

The sequences are available at GenBank: MW729401 to MW729412.

Data Availability

The following information was supplied regarding data availability:

Datasets on soil characteristics of the sampling sites where entomopathogenic nematodes were found and on the mosquito larvae mortality produced by entomopathogenic nematodes from Yucatán, Mexico are available at Zenodo: Mariana B. Ávila-López, Victor M. Vidal-Martínez. (2021). Dr. (researcher) (Version 1) [Data set]. Zenodo. DOI 10.5281/zenodo.4470024.

Supplemental Information

Supplemental information for this article can be found online at http://dx.doi.org/10.7717/peerj.11633#supplemental-information.

REFERENCES

Akhurst RJ. 1993. Bacterial symbionts of entomopathogenic nematodes the power behind the throne. In: Bedding R, Akhurst R, Kaya H, eds. *Nematodes and the Biological Control of Insect Pests*. Australia: CSIRO Publications East, Melboune, 127–135.

Altschul S, Gish W, Miller W, Myers E, Lipman D. 1990. Basic local aligment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215(3)**:403–410 DOI 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.

Alumai A, Grewal PS, Hoy CW, Willoughby DA. 2006. Factors affecting the natural occurrence of entomopathogenic nematodes in turfgrass. *Biological Control* **36(3)**:368–374 DOI 10.1016/j.biocontrol.2005.08.008.

Andaló V, Nguyen K, Moino A. 2006. *Heterorhabditis amazonensis* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Amazonas, Brazil. *Nematology* **8(6)**:853–867 DOI 10.1163/156854106779799286.

Babic I, Fischer-Le SM, Giraud E, Boemare N. 2000. Occurrence of natural dixenic associations between the symbiont *Photorhabdus luminescens* and bacteria related to *Ochrobactrum* spp. in tropical entomopathogenic *Heterorhabditis* spp. (Nematoda, Rhabditida). *Microbiology* **146(3)**:709–718 DOI 10.1099/00221287-146-3-709.

Bedding RA, Akhurst RJ. 1975. A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. *Nematologica* **21(1)**:109–110 DOI 10.1163/187529275X00419.

Bedding RA, Akhurst RJ, Kaya HK. 1993. Future prospects of entomogenous and entomopathogenic nematodes. In: Bedding R, Akhurst RJ, Kaya HK, eds. *Nematodes and the Biological Control of Insect Pests*. East Melbourne: CSIRO Australia, 157–170.

Blair A, Ritz B, Wesseling C, Freeman L. 2014. Pesticides and human health. *Occupational and Environmental Medicine* **72(2)**:81–82 DOI 10.1136/oemed-2014-102454.

Bode H. 2009. Entomopathogenic bacteria as a source of secondary metabolites. *Current Opinion in Chemical Biology* **13(2)**:224–230 DOI 10.1016/j.cbpa.2009.02.037.

Boissière A, Tchioffo MT, Bachar D, Abate L, Marie A, Nsango SE, Shahbazkia HR, Awono-Ambene PH, Levashina EA, Christen R, Morlais I. 2012. Midgut microbiota of the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae* and interactions with *Plasmodium falciparum* infection. *PLoS Pathogens* **8(5)**:e1002742 DOI 10.1371/journal.ppat.1002742.

Bruno P, Machado RAR, Glauser G, Köhler A, Campos- Herrera R, Bernal J, Toepfer S, Erb M, Robert CAM, Arce CCM, Turlings TCJ. 2020. Entomopathogenic nematodes from Mexico that can overcome the resistance mechanisms of the western corn rootworm. *Scientific Reports* **10(1)**:181 DOI 10.1038/s41598-020-64945-x.

Cadena S, Aguirre-Macedo ML, Cerqueda-García D, Cervantes FJ, Herrera-Silveira JA, García-Maldonado JQ. 2019. Community structure and distribution of benthic Bacteria and Archaea in a stratified coastal lagoon in the Southern Gulf of Mexico. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **230(1)**:106433 DOI 10.1016/j.ecss.2019.106433.

Cambon MC, Lafont P, Frayssinet M, Lanois A, Ogier JC, Pagès S, Parthuisot N, Ferdy JB, Gaudriault S. 2020. Bacterial community profile after the lethal infection of *Steinernema-Xenorhabdus* pairs into soil-reared *Tenebrio molitor* larvae. *FEMS Microbiology Ecology* **96(2)**:1 DOI 10.1093/femsec/fiaa009.

Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* **7(5)**:335–336 DOI 10.1038/nmeth.f.303.

Chitra P, Sujatha K, Alagarmalai J. 2017. Entomopathogenic nematode as a biocontrol agent: recent trends—a review. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences* **4(1)**:9–20 DOI 10.22192/ijarbs.2017.04.01.002.

Coon KL, Vogel KJ, Brown MR, Strand MR. 2014. Mosquitoes rely on their gut microbiota for development. *Molecular Ecology* **23(11)**:2727–2739 DOI 10.1111/mec.12771.

Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* **9(8)**:772–772 DOI 10.1038/nmeth.2109.

Dhakal M, Nguyen KB, Hunt DJ, Ehlers R, Spiridonov SE, Subbotin SA. 2020. Molecular identification, phylogeny and phylogeography of the entomopathogenic nematodes of the genus *Heterorhabditis* Poinar, 1976: a multigene approach. *Nematology* **23(4)**:451–466 DOI 10.1163/15685411-bja10052.

Dilipkumar A, Karthik RR, Chinnaperumal K, Balasubramani G, Paramasivam D, Arul D, Pachiappan P. 2019. Isolation and growth inhibition potential of entomopathogenic nematodes against three public health important mosquito vectors. *Experimental Parasitology* **197(2)**:76–84 DOI 10.1016/j.exppara.2018.11.001.

Dolinski C, Kamitani FL, Machado IR, Winter CE. 2008. Molecular and morphological characterization of heterorhabditid entomopathogenic nematodes from the tropical rainforest in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **103(2)**:150–159 DOI 10.1590/S0074-02762008000200005.

Eivazian KN, Mohammadi D, Girling R. 2017. New reports on dixenic associations between the symbionts of entomopathogenic nematodes, *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*, and non-symbiotic bacteria. *Journal of Crop Protection* **6(4)**:497–511.

Engel P, Moran N. 2013. The gut microbiota of insects—diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews* **37(5)**:699–735 DOI 10.1111/1574-6976.12025.

Finney DJ. 1971. *Probit analysis*. Third Edition. London: Cambridge University Press.

García-Varela M, Nadler SA. 2005. Phylogenetic relationships of Palaeacanthocephala (Acanthocephala) inferred from SSU and LSU rDNA gene sequences. *Journal of Parasitology* **91(6)**:1401–1409 DOI 10.1645/GE-523R.1.

Gee GW, Bauder JW. 1986. Particle-size analysis. In: Klute A, ed. *Methods of Soil Analysis: Part 1 Agron. Monogr. 9.* 2nd Edition. Madison, WI: ASA and SSSA, 383–411.

Girón PS, Ruiz VJ, Pérez PR, Sánchez GJA, Aquino BT. 2012. Isolation of entomopathogenic nematodes and control of *Phyllophaga vetula* Horn in Oaxaca, México. *African Journal of Biotechnology* **11**:16525–16531 DOI 10.5897/AJB12.448.

Gouge DH, Snyder JL. 2006. Temporal association of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) and bacteria. *Journal of Invertebrate Pathology* **91(3)**:147–157 DOI 10.1016/j.jip.2005.12.003.

Jackson T, Wang H, Nugent MJ, Griffin CT, Burnell AM, Dowds BCA. 1995. Isolation of insect pathogenic bacteria, *Providencia retfgeri*, from *Heterorhabditis* spp. *Journal of Applied Bacteriology* **78(3)**:237–244 DOI 10.1111/j.1365-2672.1995.tb05022.x.

Jiménez CJG, Canales LJ, Lara RN, Rosenblueth M, Martínez RE, Contreras GJ. 2016. Microbiota from *Rhabditis regina* may alter nematode entomopathogenicity. *Parasitology Research* **115(11)**:4153–4165 DOI 10.1007/s00436-016-5190-3.

Kaya HK, Stock SP. 1997. Techniques in insect nematology. In: Lacey LA, ed. *Manual of Techniques in Insect Pathology.* London: Academic Press, 281–324.

Kovendan K, Chandramohan B, Govindarajan M, Jebanesan A, Kamalakannan S, Vincent S, Benelli G. 2018. Orchids as sources of novel nanoinsecticides? Efficacy of *Bacillus sphaericus* and *Zeuxine gracilis*-fabricated silver nanoparticles against dengue, malaria and filariasis mosquito vectors. *Journal of Cluster Science* **29(2)**:345–357 DOI 10.1007/s10876-018-1331-4.

Kuo S. 1996. Phosphorus. In: Sparks DL, ed. *Methods of Soil Analysis Part 3: Chemical Methods, SSSA Book Series 5.* Madison, Wisconsin: Soil Science Society of America, 869–920.

Lacey LA, Kaya HK. 2000. Field manual of techniques in invertebrate pathology. *Journal of Invertebrate Pathology* **84**:15–23 DOI 10.1007/978-94-017-1547-8.

Lalitha K, Karthi S, Vengateswari G, Karthikraja R, Perumal P, Shivakumar MS. 2018. Effect of entomopathogenic nematode of *Heterorhabditis indica* infection on immune and antioxidant system in lepidopteran pest *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Parasitic Diseases* **42(2)**:204–211 DOI 10.1007/s12639-018-0983-1.

Malan AP, Knoetze R, Tiedt L. 2014. *Heterorhabditis noenieputensis* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae): a new entomopathogenic nematode from South Africa. *Journal of Helminthology* **88(2)**:139–151 DOI 10.1017/S0022149X12000806.

Nadler SA, Hudspeth DSS. 1998. Ribosomal DNA and phylogeny of the Ascaridoidea (Nemata: Secernentea): implications for morphological evolution and classification. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **10(2)**:221–236 DOI 10.1006/mpev.1998.0514.

Nelson DW, Sommers LE. 1996. Total carbon, organic carbon, and organic matter. In: Sparks DL, ed. *Methods of Soil Analysis: Part 3—Chemical Methods, Agronomy Monograph.* Madison, Wisconsin: American Society of Agronomy-Soil Science Society of America, 961–1010.

Nguyen KB, Mrek ZK, Webster JM. 2006. Morphological and molecular characterization of a new isolate of *Steinernema feltiae* (Filipjev, 1934) from Vancouver, Canada, with morphometrical comparison with the topotype population from Russia. *Zootaxa* **1132(1)**:51–619 DOI 10.11646/zootaxa.1132.1.3.

Nguyen KB, Shapiro ID, Mbata GN. 2008. *Heterorhabditis georgiana* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Georgia, USA. *Nematology* **10(3)**:433–448 DOI 10.1163/156854108783900276.

Nguyen NC, Shapiro I, Stuart DL, McCoy RJ, James RR, Adams BJ. 2004. *Heterorhabditis mexicana* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Tamaulipas, Mexico and morphological studies of the bursa of *Heterorhabditis* spp. *Nematology* **6(2)**:231–244 DOI 10.1163/1568541041218031.

Nthenga I, Knoetze R, Berry S, Tiedt LR, Malan AP. 2014. *Steinernema sacchari* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae): a new entomopathogenic nematode from South Africa. *Nematology* **16(4)**:475–494 DOI 10.1163/15685411-00002780.

Olvera A, Benoit P, Barriuso E, Ortiz L. 2008. Sorption and desorption of organophosphate pesticides, parathion and cadusafos, on tropical agricultural soils. *Agronomy for Sustainable Development* **28(2)**:231–238 DOI 10.1051/agro:2008009.

Pandii W, Maharmart S, Boonchuen S, Silapanuntakul S, Somsook V. 2008. Efficacy of entomopathogenic nematodes (Nematoda: Rhabditida) against *Culex gelidus* (Diptera: Culicidae) larvae. *Journal of Vector Borne Diseases* **5**:24–35.

Patrick Jr. WH, Gambrell RP, Faulkner SP. 1996. REDOX measurements of soils. In: Sparks DL, ed. *Methods of Soil Analysis: Part 3. Chemical Methods, Agronomy Monograph*. Madison, Wisconsin: American Society of Agronomy-Soil Science Society of America, 1085–1123.

Peschiutta ML, Cagnolo SR, Almirón WR. 2014. Susceptibility of larvae of *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae) to entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar) (Rhabditida: Heterorhabditidae). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina* **73**:99–108.

Peters A. 1994. Susceptibility of Leatherjackets (*Tipula paludosa* and *Tipula oleracea*; Tipulidae; Nematocera) to the Entomopathogenic Nematode *Steinernema feltiae*. *Journal of Invertebrate Pathology* **63(2)**:163–171 DOI 10.1006/jipa.1994.1031.

Peters A, Ehlers R. 1997. Encapsulation of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* in *Tipula oleracea*. *Journal of Invertebrate Pathology* **69(3)**:218–222 DOI 10.1006/jipa.1996.4648.

Plante AF, Conant RT, Stewart CE, Paustian K, Six J. 2006. Impact of soil texture on the distribution of soil organic matter in physical and chemical fractions. *Soil Science Society of America Journal* **70(1)**:287–296 DOI 10.2136/sssaj2004.0363.

Poinar GO Jr, Thomas GM. 1966. Significance of *Achromobacter nematophilus* Poinar and Thomas (Achromobacteraceae: Eubacteriales) in the development of the nematode, DD-136 (Neoaplectana sp., Steinernematidae). *Parasitology* **56(2)**:385–390 DOI 10.1017/S0031182000070980.

Polanco RAG, Navarro AJN, Solorio SJ, Mena RGJ, Marrufo GJM, Del Valls Casillas TA. 2015. Contamination by organochlorine pesticides in the aquifer of the Ring of Cenotes in Yucatán, México. *Water and Environment Journal* **29(1)**:140–150 DOI 10.1111/wej.12080.

Rambaut A. 2016. FigTree v1.4.3. molecular evolution, phylogenetics and epidemiology. *Available at http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/* (accessed 7 January 2021).

Rhoades JD. 1996. Salinity: electrical conductivity and total dissolved solids. In: Sparks DL, ed. *Methods of Soil Analysis: Part 3—Chemical Methods, Agronomy Monograph*. Madison, Wisconsin: American Society of Agronomy-Soil Science Society of America, 417–436.

Rodríguez D, Torres M, Uribe L, Flores L. 2009. Susceptibilidad de los estadios L2 y L3 de *Phyllophaga elenans* a una cepa nativa de *Heterorhabditis* sp. en condiciones de invernadero. *Agronomia Costarricense* **33**:171–182.

Rojas-Pinzón PA, Dussán J. 2017. Efficacy of the vegetative cells of *Lysinibacillus sphaericus* for biological control of insecticide-resistant *Aedes aegypti*. *Parasites & Vectors* **10(1)**:231 DOI 10.1186/s13071-017-2171-z.

Saleh MME, Hanounik SB, Al-muhanna UE, Al-dahir H, Al-garrash ZH. 2001. Distribution of *Heterorhabditis indica* (Nematoda: Heterorhabditidae) in eastern Saudi Arabia. *International Journal of Nematology* **11**:215–218.

Salgado-Morales R, Martínez-Ocampo F, Obregón-Barboza V, Vilchis-Martínez K, Jiménez-Pérez A, Dantan E. 2019. Assessing the pathogenicity of two bacteria isolated from the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis indica* against *Galleria mellonella* and some pest insects. *Insects* **10(3)**:83 DOI 10.3390/insects10030083.

San-Blas E, Gowen S, Pembroke B. 2008. *Steinernema feltiae*: ammonia triggers the emergence of their infective juveniles. *Experimental Parasitology* **119(1)**:180–185 DOI 10.1016/j.exppara.2008.01.008.

Sen-Selvan J, Campbell F, Gaugler R. 1993. Density-dependent effects on entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae) within an insect host. *Journal of Invertebrate Pathology* **62(3)**:278–284 DOI 10.1006/jipa.1993.1113.

Stamatakis A. 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* **22(21)**:2688–2690 DOI 10.1093/bioinformatics/btl446.

Stock SP, Rivera-Orduño B, Flores-Lara Y. 2009. *Heterorhabditis sonorensis* n. sp. (Nematoda: Heterorhabditidae): a natural pathogen of the seasonal cicada *Diceroprocta ornea* (Walker) (Homoptera: Cicadidae) in the Sonoran desert. *Journal of Invertebrate Pathology* **100(3)**:175–184 DOI 10.1016/j.jip.2008.11.011.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* **30(12)**:2725–2729 DOI 10.1093/molbev/mst197.

Thanwisai A, Tandhavanant S, Saiprom N, Waterfield NR, Ke Long P, Bode HB, Peacock SJ, Chantratita N. 2012. Diversity of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp. and their symbiotic entomopathogenic nematodes from Thailand. *PLOS ONE* **7(9)**:e43835 DOI 10.1371/journal.pone.0043835.

Thomas GW. 1996. Soil pH and soil acidity. In: Sparks DL, ed. *Methods of Soil Analysis: Part 3—Chemical Methods, Agronomy Monograph*. Madison, Wisconsin: American Society of Agronomy-Soil Science Society of America, 475–490.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22(22)**:4673–4680 DOI 10.1093/nar/22.22.4673.

Valencia-Agami SS, Cerqueda-García D, Putzeys S, Uribe-Flores MM, García-Cruz NU, Pech D, Herrera-Silveira J, Aguirre-Macedo ML, García-Maldonado JQ. 2019. Changes in the bacterioplankton community structure from Southern Gulf of Mexico during a simulated crude oil spill at Mesocosm scale. *Microorganisms* **7(10)**:441 DOI 10.3390/microorganisms7100441.

Yooyangket T, Muangpat P, Polseela R, Tandhavanant S, Thanwisai A, Vitta A. 2018. Identification of entomopathogenic nematodes and symbiotic bacteria from Nam Nao National Park in Thailand and larvicidal activity of symbiotic bacteria against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *PLOS ONE* **13**:e019568 DOI 10.1371/journal.pone.019568.