



NEMÁTODOS ENTOMOPÁTÓGENOS NATIVOS EN EL CULTIVO DE NOPAL VERDURA EN MILPA ALTA, MÉXICO †

[NATIVE ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES IN THE CULTIVATION OF PRICKLY PEAR IN MILPA ALTA, MEXICO]

Evert Villanueva-Sánchez^{1*}, Samuel Ramírez-Alarcón²,
Clemente Villanueva-Verduzco³ and José Enrique Herbert-Pucheta¹

¹Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-Laboratorio Nacional de Investigación y Servicio Agroalimentario y Forestal, Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México-Texcoco Km 38.5, 56230 Chapingo, Estado de México, México. Email. * evillanueva@conacyt.mx, jeherbert@conacyt.mx

²Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México-Texcoco Km 38.5, 56230 Chapingo, Estado de México, México. Email. ramirezsamuel@hotmail.com

³Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México-Texcoco Km 38.5, 56230 Chapingo, Estado de México, México. Email. clemente.villanueva@gmail.com

*Corresponding author

SUMMARY

Background. Entomopathogenic nematodes (NEP) are found in all ecosystems. Currently, they are one of the most studied ecological alternatives for the biological control of insect pests. In Mexico, there are few reports of their presence in agricultural soils. **Objective.** To isolate and identify molecularly native specimens of entomopathogenic nematodes from soil samples collected in different prickly pear producing areas in Milpa Alta, Mexico City. **Methodology.** Isolations were obtained from soil samples using the technique of insect lure (*Galleria mellonella* or greater wax moth). Molecular techniques of the ribosomal region (ITS1+5.8S+ITS2) were performed for nematode identification. **Results.** Of the NEP isolates for the genus *Steinernema*, the phylogenetic analysis (ML; HKY) grouped the sequences of the isolates in the species *Steinernema texanum*, with 100 % similarity and 81 % similarity between isolates. For *Heterorhabditis*, the analysis (M; HKY) grouped the sequenced isolates in the species *Heterorhabditis atacamensis* with 97 % similarity. The results show that the NEP are widely distributed in the study region. **Implications.** The presence of these isolates in the cultivation of prickly pear (nopalitos) is important since they are a potential biological tool for pest management in the study zone. **Conclusion.** For the first time, the presence of *Steinernema texanum* and *Heterorhabditis atacamensis* is reported in soils cultivated with prickly pear in Milpa Alta, Mexico.

Key words: *Opuntia ficus-indica* L.; *Steinernema*; *Heterorhabditis*.

RESUMEN

Antecedentes. Los nematodos entomopatógenos (NEP) se encuentran distribuidos en todos los ecosistemas. Actualmente son una de las alternativas ecológicas más estudiadas para el control biológico de insectos plaga. En México, existen pocos reportes de su presencia en suelos agrícolas. **Objetivo.** Aislamiento e identificación molecular de ejemplares nativos de nematodos entomopatógenos, provenientes de muestras de suelo de diferentes zonas productoras de nopal en Milpa Alta, Ciudad de México. **Metodología.** Los aislamientos se obtuvieron de muestras de suelo utilizando la técnica del insecto cebo (*Galleria mellonella* o polilla de la cera). Se realizaron técnicas moleculares de la región ribosomal (ITS1+5.8S+ITS2) para su identificación. **Resultados.** De los aislados de NEP para el género *Steinernema*, el análisis filogenético (ML; HKY) agrupó las secuencias de los aislados en la especie *Steinernema texanum* con 100 % de similitud y 81 % de similitud entre los aislados; para *Heterorhabditis*, el análisis (ML; HKY), agrupó a los aislados secuenciados en la especie *Heterorhabditis atacamensis* con 97 % de similitud. Los resultados demuestran que los NEP están ampliamente distribuidos en la región de estudio. **Implicaciones.** La presencia de estos aislamientos en el cultivo de nopal verdura es importante ya que pueden representar una herramienta biológica y potencial para el manejo de plagas en la zona de estudio. **Conclusión.** Se reporta por primera vez la presencia de *Steinernema texanum* y *Heterorhabditis atacamensis* en suelos cultivados con nopal verdura en Milpa Alta, México. **Palabras clave:** *Opuntia ficus-indica* L.; *Steinernema*; *Heterorhabditis*.

† Submitted November 30, 2021 – Accepted June 6, 2022. <http://doi.org/10.56369/tsaes.4123>



INTRODUCCIÓN

Los nematodos entomopatógenos (NEP) se han recuperado de suelos de todo el mundo. Se han descrito al menos 96 especies del género *Steinernema*, 1 del género *Neosteinernema* y 21 del género *Heterorhabditis* (Lewis y Clarke, 2012, Shapiro-Ilan *et al.*, 2017). Los géneros *Heterorhabditis* y *Steinernema* son considerados biocontroladores eficientes de un amplio rango de insectos plaga de diferentes hábitats (suelo, foliares y ambientes crípticos) (Askary, 2010, Fimbres y Flores-Lara, 2016, Ascary y Abd-Elgawad, 2017). Todas las especies de NEP conocidas comparten una biología similar. La única etapa que sobrevive fuera del huésped es el juvenil infectivo (JI) o juvenil *dauer*, el cual no se alimenta ni se desarrolla. Los JI utilizan señales ambientales y del huésped para localizar, reconocer y aceptar insectos como posibles huéspedes. Entran a éste a través de aberturas naturales (boca, ano, espiráculos) o penetran directamente a través de partes delgadas de la cutícula. Después de establecerse en el hemocele, los JI mudan y liberan sus bacterias simbiotas a través de la defecación o regurgitación (Ciche *et al.*, 2008). Los nematodos y las bacterias cooperan para matar al insecto susceptible en un plazo de 24 a 48 h (Koppenhöfer *et al.*, 2020). Las bacterias simbiotas de los NEP pertenecen a los géneros *Photorhabdus* (*Heterorhabditis* spp.) y *Xenorhabdus* (*Steinernema* spp.) (Koppenhöfer *et al.*, 2020).

El estudio de NEP en Latinoamérica ha sido escaso (Poinar, 1990, Kaya *et al.*, 2006) así como han sido escasos los reportes de aislamientos de especies nativas en México (Lezama *et al.*, 2001, Cortez *et al.*, 2003, Ruiz *et al.*, 2003, Molina-Ochoa *et al.*, 2003, Nguyen *et al.*, 2004, Girón *et al.* 2012, Aquino *et al.*, 2016, Grifaldo *et al.*, 2019, Grifaldo *et al.*, 2020). El contar con aislamientos nativos de NEP adaptados a las condiciones edafoclimáticas de cada región, es fundamental para el establecimiento de estrategias biológicas exitosas en Programas de Manejo Integrado de Plagas. Aunado a esto, *Opuntia ficus-indica* L. (Caryophyllales: Cactaceae) es la cactácea más importante en la economía de México para la producción de nopal verdura y fruto para consumo en fresco; se cultivan 12,618 ha y se producen cerca de 864,243 t por año (SIAP, 2021); además, ésta especie es afectada por diversas plagas, las cuales son una de las limitantes más importantes en la producción. Por lo anterior, este estudio tuvo como objetivo aislar e identificar molecularmente ejemplares nativos de nematodos entomopatógenos, provenientes de muestras de suelo de diferentes zonas productoras de nopal en Milpa Alta, Ciudad de México, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de muestras de suelo

Se recolectaron muestras de suelo en diferentes lotes de zonas productoras de nopal verdura pertenecientes a Milpa Alta, Ciudad de México, México (Tabla 1). En cada lote, se tomaron al azar 9 muestras de suelo de 250 g a una profundidad de 20 cm. Las muestras de suelo se etiquetaron y fueron llevadas al laboratorio, en donde se mantuvieron almacenadas a una temperatura de 4 °C hasta su procesamiento, el cual se realizó 24 h después de ser recolectadas.

Tabla 1. Distribución de los sitios de muestreo.

Lote	Zona productora	Localización
A	Volcán Teutli Zona Alta	19.24 N 98.96 W
B	Volcán Teutli Zona Media	19.21 N 99.03 W
4.2	Volcán Teutli Zona Baja	19.20 N 99.03 W
D	Paraje Noxcalco, San Antonio Tecómitl	19.17 N 99.11 W
E	Paraje Noxcalco, San Antonio Tecómitl	19.19 N 99.13 W
4.3	Paraje Acalco, San Pedro Atocpan	19.19 N 99.04 W

Procesamiento de muestras de suelo y trampeo de nematodos entomopatógenos

Las muestras de suelo recolectadas en campo se procesaron mediante el método del insecto cebo *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) (Sturhan y Mracek, 2000), el cual es utilizado para la obtención de nematodos entomopatógenos. Para ello se estableció una cría de *G. mellonella* bajo condiciones controladas (28 °C, 60 % H.R. y un fotoperiodo de 24 h oscuridad). Cada muestra de suelo recolectada fue tamizada (tamiz de 2 mm) para eliminar el exceso de materia orgánica, basura y piedras que pudieran dañar físicamente las larvas de *G. mellonella* utilizadas como insecto cebo. Las muestras tamizadas se humedecieron a capacidad de campo con agua destilada estéril y se dividieron, cada una, en submuestras de 100 g. Las submuestras se colocaron en recipientes de plástico de 100 g de capacidad junto con cuatro larvas de *G. mellonella* de último instar, posteriormente, a los recipientes de plástico se les colocó una tapa del mismo material. Los recipientes de plástico se mantuvieron a temperatura ambiente por cuatro días. Transcurrido ese tiempo, se sacaron las larvas de *G. mellonella* de los recipientes y se separaron aquellas que presentaron síntomas de infección por efecto de nematodos entomopatógenos, las cuales fueron colocadas en trampas White (White,

1927) para la obtención de los Juveniles Infeccivos (JI). Los JI obtenidos de las trampas White, se lavaron tres veces con una solución de Cloruro de Benzalconio al 0.1 % y dos veces con agua destilada estéril. Se obtuvo un concentrado de JI limpios por lote, es decir, que los JI obtenidos de las muestras positivas de cada lote se conjuntaron en frascos para cultivo (Corning) con un volumen de 250 mL a temperatura ambiente para su almacenamiento y posterior análisis molecular. Por último, se corroboró el efecto entomopatígeno de los 6 aislamientos de nematodos obtenidos de los sitios de muestreo (A, B, 4.2, D, E y 4.3), a través del establecimiento de cámaras húmedas utilizando larvas nuevas de *G. mellonella* y los JI almacenados en las cajas para cultivo. Una cámara húmeda consistió en una caja Petri de plástico de 60 x 15 mm provista con dos círculos de papel filtro Whatman No.1, 100 JI de un aislamiento almacenado y cuatro larvas de *G. mellonella*. Después de cuatro días se monitorearon las larvas para detectar la sintomatología ocasionada por los nematodos aislados y evaluados en el presente estudio. Así mismo, se disectaron las larvas para realizar preparaciones temporales y observar bajo microscopio compuesto las estructuras de los nematodos encontrados y determinar si se trataban de nematodos entomopatógenos.

Extracción de ADN y amplificación de la región ITS

La extracción de ADN se realizó a partir de 20 mg de juveniles infeccivos (JI) liofilizados de los seis aislamientos obtenidos (A, B, 4.2, D, E y 4.3). La extracción se realizó con el Kit DNeasy Plant Mini (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad del ADN extraído se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5 %, con buffer TBE al 1X a 100 volts por 25 minutos. Finalmente, el gel se tiñó con bromuro de etidio (0.2 µg/mL) y la presencia de ADN se registró con un fotodocumentador Gene Wizard. Posteriormente, se amplificó la región de los ITS que incluyen la región conservada del 5.8S mediante los iniciadores (primers) TW81 (5'-GTTTCCGTAGGTGAACCTGC-3') (Joyce *et al.*, 1994) con sentido (Pf) y AB28 (5'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGT-3') (Howlett *et al.*, 1992) con sentido (Pr) que amplifican aproximadamente 927 pb de la fracción 18S rADN (parcial 3') ITS1, 5.8S, ITS2 y 28S (parcial 5') (Spiridonov *et al.*, 2004, Skantar *et al.*, 2007, Eustachio *et al.*, 2008). Las reacciones de PCR se realizaron en tubos Eppendorf de 0.2 mL en un volumen total de 25 µL. Cada reacción contenía 0.2 µM de cada primer, 150 µM de cada dNTP (Promega), 0.5 unidades de Taq polimerasa (Promega) en buffer de reacción 1x y 2 µL de ADN. Las reacciones fueron llevadas a cabo en un termociclador MyCycler (BIO-RAD), donde las condiciones fueron: un ciclo de 94 °C por 2 minutos, 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 37

°C por 1.5 minutos, 60 °C por 1.5 minutos, y un ciclo de extensión de 72 °C por 5 minutos. La amplificación en todos los casos se corroboró mediante electroforesis siguiendo el procedimiento de visualización mencionado anteriormente dentro del proceso de extracción de ADN. La limpieza del producto de PCR se realizó con el kit QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto amplificado se envió a la compañía Macrogen (Korea) para su secuenciación. La secuenciación se realizó en ambos sentidos con los iniciadores empleados para la amplificación inicial.

Análisis filogenético

Las secuencias obtenidas se limpiaron y ensamblaron con el programa BIOEDIT 7.0.4, se alinearon con el programa ClustalW, algoritmo del programa MEGA X (Kumar, *et al.*, 2018) y se compararon con las secuencias existentes del banco de genes NCBI a través del BLAST (Zhang *et al.*, 2000). La reconstrucción de la filogenia se realizó para los dos géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis*, se obtuvieron secuencias entre 646-716 pb. Se utilizaron secuencias del GenBank para comparar las obtenidas con el programa jModeltest 2.1, se estimó el mejor modelo el cual fue Tamura 3-parametros, inferido por el método Máxima Verosimilitud (ML), con la probabilidad logarítmica de -4697.37. La búsqueda completa del árbol inicial fue por el método Neighbor-Joining y BioNj utilizando la matriz de distancia por pares, estimada por el modelo Tamura 3. La Topología fue de valor logarítmico de verosimilitud superior, la tasa de variación fue ([+I], 14.69 %), se utilizó la escala de 0.20. El análisis involucró 28 secuencias de nucleótidos, para el análisis se utilizó el programa MEGA X.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamientos encontrados de nematodos entomopatógenos

En total se recolectaron 54 muestras de suelo, de las cuales 50 resultaron positivas a presencia de nematodos entomopatógenos. En los tres lotes pertenecientes al Volcán Teutli se encontraron nematodos entomopatógenos del género *Steinernema*, para el caso de los dos lotes pertenecientes al Paraje Noxcalco, San Antonio Tecómitl se encontró el género *Heterorhabditis* y para el lote perteneciente al Paraje Acalco, San Pedro Atocpan el género *Steinernema*, obteniéndose así 6 aislamientos de nematodos entomopatógenos (Tabla 2).

Tabla 2. Muestras positivas a presencia de nematodos entomopatógenos (NEP) por lote.

Lote	Zona productora	Muestras positivas	Género de NEP
A	Volcán	9	<i>Steinernema</i>
	Teutli Zona Alta		
B	Volcán	9	<i>Steinernema</i>
	Teutli Zona Media		
4.2	Volcán	9	<i>Steinernema</i>
	Teutli Zona Baja		
D	Paraje	9	<i>Heterorhabditis</i>
	Noxcalco, San Antonio Tecómitl		
E	Paraje	7	<i>Heterorhabditis</i>
	Noxcalco, San Antonio Tecómitl		
4.3	Paraje	7	<i>Steinernema</i>
	Acalco, San Pedro Atocpan		

Análisis filogenético

Las secuencias de los aislamientos encontrados fueron depositadas en el GenBank. Se obtuvieron cuatro secuencias de *Steinernema* (Nem4.2 ID: MN220526, Nem4.3 ID: MN220527, NemA1 ID: MN220528 y NemB2 ID: MN220529), las cuales tuvieron entre 646 y 670 pares de bases (pb), y dos secuencias de *Heterorhabditis* (NemD2 ID: MN220530 y NemE2 ID: MN220531), el análisis filogenético se realizó en un solo árbol (Figura 1).

Con base en el análisis molecular realizado en este estudio, los tres aislamientos obtenidos de las muestras de suelo recolectadas en el Volcán Teutli (NemA1, NemB2 y Nem4.2), así como el aislamiento obtenido del Paraje Acalco, San Pedro Atocpan (Nem4.3), corresponden a la especie *Steinernema texanum*. Por otro lado, los dos aislamientos obtenidos del Paraje Noxcalco, San Antonio Tecómitl (NemD2 y NemE2) corresponden a la especie *Heterorhabditis atacamensis*. En este sentido, Hominick *et al.* (1996) mencionaron que la biodiversidad de steinernematidos es mayor que la de heterorhabditidos, lo cual fue consistente con los resultados obtenidos en este estudio. En México, es poca la información con respecto al potencial, identificación y distribución de nematodos entomopatógenos nativos, que puedan permitir la selección de aislamientos promisorios como alternativa de control de plagas. Sin embargo, los registros existentes confirman lo mencionado por

Hominick *et al.* (1996). Delgado-Gamboa *et al.* (2014) realizaron un listado de las cepas nativas que han sido aisladas e identificadas en México. En Oaxaca, México, en campos cultivados con maíz, Giron *et al.* (2012) colectaron 55 muestras de suelo, de las cuales, en 27 hubo presencia de nematodos entomopatógenos, de los cuales 81 % pertenecieron al género *Steinernema* y 19 % al género *Heterorhabditis*. Las cepas fueron identificadas mediante secuenciación de ADN, encontrando a *Heterorhabditis mexicana*, *Steinernema carpocapse* y *Steinernema feltiae*. En Guanajuato, México, Negrete-García (2013) reportó el aislamiento de dos cepas del género *Steinernema*. En los Altos Jalisco, Díaz-Maderos (2022) reportó el aislamiento de una cepa de *Heterorhabditis*. En Sonora, Stock *et al.* (2009) aislaron de ninfas de *Dicerorhynchus ornea* (Homoptera: Cicadidae) en campos cultivados con espárrago en Caborca, la especie *Heterorhabditis sonorensis*. González-Ramírez (2006) colectaron 147 muestras de suelo de 89 localidades de los estados de Colima, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Sinaloa y Veracruz, reportando un total de 35 muestras positivas, de las cuales el 71.4 % correspondieron al género *Steinernema* y 28.6 % a *Heterorhabditis*.

Las especies de nematodos entomopatógenos (NEP) pertenecientes a las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae han llamado la atención a nivel mundial, ya que han demostrado ser prometedores agentes de biocontrol de insectos plaga del suelo, foliares y crípticos (Askary, 2010, Askary y Abd-Elgawas, 2017), también por ser habitantes naturales en el suelo, se encuentran ampliamente distribuidos en todos los continentes, excepto en la Antártica (Bhat *et al.*, 2020). Aunado a esto, la utilización de especies nativas, que ya se encuentran adaptadas a las condiciones ambientales de los sitios de donde fueron aisladas, las posiciona como una alternativa al uso de pesticidas químicos en los Programas de Manejo Integrado de Plagas. Al respecto, las dos especies de nematodos entomopatógenos encontradas en este estudio, *Steinernema texanum* y *Heterorhabditis atacamensis*, han sido reportadas como presentes en otros países del continente americano. Nguyen *et al.* (2007) encontraron nuevos aislamientos de *Steinernema texanum* n. sp. utilizando la técnica del insecto cebo (*Galleria mellonella*) a partir de muestras de suelo tomadas cerca de Kingsville, Texas, USA. Edgington *et al.* (2011) reportaron la presencia de *Heterorhabditis atacamensis* en suelos de San Pedro de Atacama Chile. Bruno *et al.* (2020) recuperaron 40 aislamientos de nematodos entomopatógenos, mediante el método del insecto cebo, de muestras de suelo mixto de campos de maíz de los estados de Oaxaca, Jalisco, Michoacán, Guanajuato, Zacatecas y Durango. Los NEP recuperados pertenecieron a las especies *Heterorhabditis indica*, *Heterorhabditis atacamensis*, *Heterorhabditis mexicana*, *Heterorhabditis*

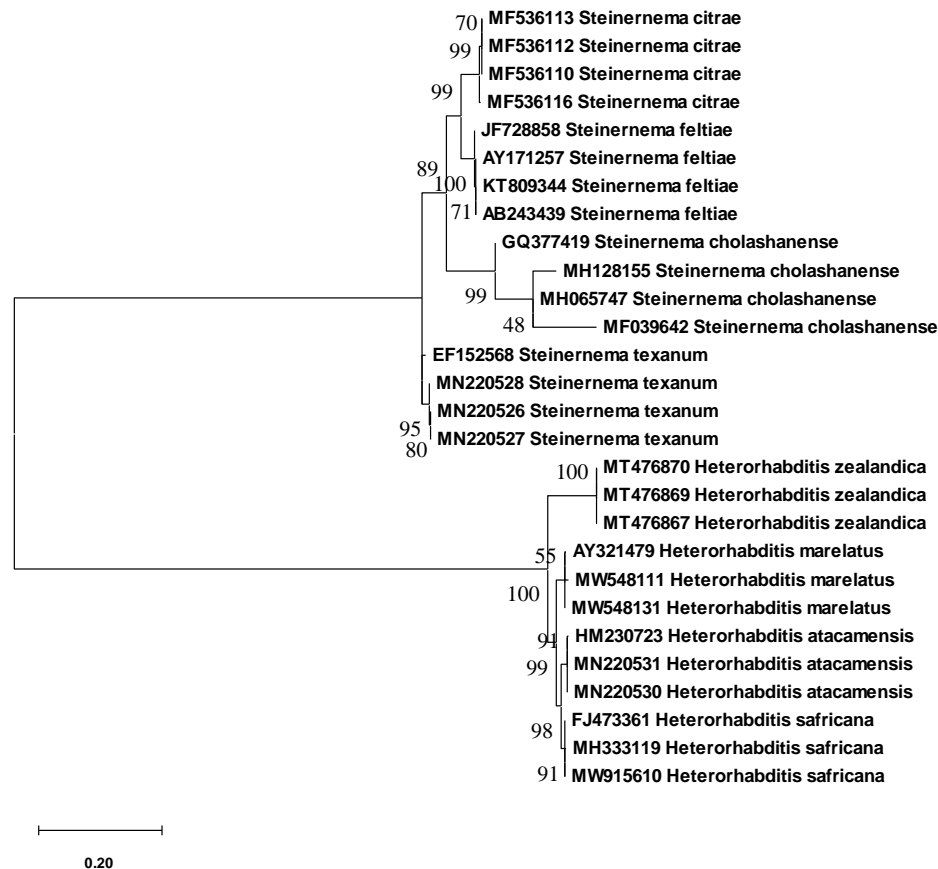


Figura 1. La relación filogenética envuelve 28 secuencias de nucleótidos divididas en dos grupos principales (*Steinernema* y *Heterorhabditis*). Para separar las especies del género *Steinernema* se compararon con tres grupos, los aislamientos Nem4.2 (MN220526), Nem4.3 (MN220527), NemA1 (MN220528), NemB2 (MN220529), se agruparon en la especie *Steinernema texanum*; en el caso del género *Heterorhabditis* los aislamientos NemD2 (MN220530) y NemE2 (MN220531) se compararon con tres especies, agrupándose en *Heterorhabditis atacamensis*. El análisis completo fue basado en la región ITS rDNA (5.8S), inferido desde el método de Máxima Verosimilitud (ML), con el modelo Tamura 3-parametros y 1000 réplicas de Bootstrap.

bacteriophora, *Steinernema riobrave* y una especie potencialmente nueva estrechamente relacionada con *Heterorhabditis bacteriophora*. Cabe resaltar que la especie *Heterorhabditis atacamensis* solo fue encontrada en el estado de Guanajuato. Machado *et al.* (2019) aislaron del tubo digestivo de *Heterorhabditis atacamensis* y *Heterorhabditis mexicana*, aislamientos recuperados de muestras de suelo mexicano, dos bacterias Gram-negativas, en forma de bastón, no formadoras de esporas, (MEX20-17T y MEX47-22T, respectivamente).

Pacheco *et al.* (2019) realizaron una revisión de los organismos entomopatógenos como control biológico en los sectores agropecuario y forestal de México, en la cual se menciona el uso de diferentes especies de NEP, sin embargo, no se mencionan las especies encontradas en este estudio. Lezama *et al.* (1996) encontraron que *Steinernema carpocapsae* y

Steinernema riobrave son eficientes para el combate de larvas de tercer estadio de mosca mexicana de la fruta (*Anastrepha ludens*), plaga que ataca especialmente cítricos y mango. Toledo *et al.* (2001) evaluaron la capacidad parasítica de *Steinernema feltiae* y *Heterorhabditis bacteriophora* en condiciones de laboratorio sobre larvas de *Anastrepha ludens*. Molina *et al.* (1996) identificaron que *Steinernema carpocapsae* cepa All, *Steinernema riobrave* y *Heterorhabditis megidis* poseen potencial como agentes de biocontrol contra *Spodoptera frugiperda*. Por otro lado, en otros países, existe registro del uso de *Heterorhabditis atacamensis* en el manejo de coleópteros. Amador *et al.* (2015) en Costa Rica, evaluaron el efecto *in vitro* de *Heterorhabditis atacamensis* CIA-NE07 sobre larvas y adultos de *Cosmopolites sordidus*. Las larvas expuestas a este nematodo entomopatógeno presentaron mortalidad del 88 % al segundo día y 100 % al tercer día, no se

observó mortalidad de adultos. Los resultados indicaron que este NEP es capaz de localizar e infectar larvas de *Cosmopolites sordidus* dentro del corno de plátano. Para el caso de los coleópteros, los nematodos del género *Heterorhabditis* son altamente infectivos (Amador *et al.*, 2015). Nematodos entomopatógenos del género *Heterorhabditis* y *Steinernema* ya se están utilizando con éxito en el control biológico del gusano blanco *Melolontha melolontha* (Scarabaeidae: Coleoptera) en Europa (Simard *et al.*, 2001, Erbas, *et al.*, 2014). Los nematodos entomopatógenos son seguros para el agricultor y en el ambiente y presentan la ventaja de que pueden buscar activamente a su hospedero, aunque se encuentre protegido (Bortoluzzi *et al.*, 2013). Por lo anterior es que los NEP encontrados en este estudio, pueden ser de utilidad como una herramienta dentro del Manejo Integrado de Plagas en el cultivo de nopal, para la regulación tanto de aquellas que habitan en el suelo como las que se encuentran barrenando alguna parte de la planta.

CONCLUSIÓN

Se reporta por primera ocasión la presencia de nematodos entomopatógenos en suelos agrícolas cultivados con nopal verdura (*Opuntia ficus-indica* L), en la región productora de Milpa Alta, Ciudad de México, México. Se encontraron las especies *Steinernema texanum* y *Heterorhabditis atacamensis*. Se deben realizar estudios morfológicos complementarios a la identificación de los aislamientos encontrados, así, como ensayos de patogeneidad y virulencia que ayuden a seleccionar los mejores aislamientos como posibles agentes de control biológico contra plagas de la región.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Dra. María Guadalupe Carrillo Benítez y al Dr. Pedro Fabián Grifaldo Alcántara por su asistencia en la identificación molecular.

Funding. All authors declare not having received any funding in the development of our research.

Conflict of interest. All authors declare not having any conflict of interest in this article that has affected the performance of the same.

Compliance with ethical standards. Due to the nature of the study this does not apply.

Data availability. Data are available upon request with the corresponding author at: evillanueva@conacyt.mx

Author contribution statement (CRediT). E. Villanueva-Sánchez - Formal Analysis, Investigation, Methodology, Writing, Review and Editing., S.

Ramírez-Alarcón - Methodology and Investigation., C. Villanueva-Verduzco - Investigation, Methodology, Writing and Editing., J.E. Herbert-Pucheta - Methodology.

REFERENCIAS

- Amador, M., Molina, D., Guillen, C., Parajeles, E., Jiménez, K. and Uribe, L., 2015. Utilización del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis atacamensis* CIA-NE07 en el control del picudo del banano *Cosmopolites sordidus* en condiciones in vitro. *Agronomía Costarricense*, 39, pp. 47-60. https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0377-94242015000300047
- Aquino, B. T., Ruiz, V. J. and Iparraguirre, C. M., 2006. Control biológico del picudo negro (*Scyphophorus interstitialis* Gyllenhal) con nematodos y hongos entomopatógenos en agave en Oaxaca, México. *Revista UDO Agrícola*, 6, pp. 92-101.
- Askary, T. H., 2010. Nematodes as biocontrol agents. In: E. Lichtfouse, eds. *Sociology, organic farming, climate change and soil science*. Springer, The Netherlands. pp. 347-378. https://doi.org/10.1007/978-90-481-3333-8_13.
- Askary, T. H. and Abd-Elgawad, M. M. M., 2017. Beneficial nematodes in agroecosystem: A global perspective. In: Abd-Elgawad M. M. M., Askary, T. H. Coupland, eds. *Biocontrol Agents: entomopathogenic and slug parasitic nematodes*. *CAB International*. pp. 3-25. <https://doi.org/10.1079/9781786390004.0003>.
- Bhat, A. H., Chaubey, A. K., and Askary, T. H., 2020. Global distribution of entomopathogenic nematodes, *Steinernema* and *Heterorhabditis*. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 30, pp. 1-15. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-0212>
- Bortoluzzi, L., Alves, L. F. A., Alves, V. S. and Holz, N., 2013. Entomopathogenic nematodes and their interaction with chemical insecticide aiming at the control of banana weevil borer. *Cosmopolites sordidus* Germar (Coleoptera: Curculionidae). *Arquivos do Instituto Biológico*, 80, pp. 183-192. <https://doi.org/10.1590/S1808-16572013000200007>.
- Bruno, P., Machado, R.A.R., Glauser, G., Köhler, A. and Campos-Herrera., 2020. Entomopathogenic nematodes from Mexico that can overcome the resistance mechanisms

- of the western corn rootworm. *Scientific Reports*, 10, pp. 8257. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64945-x>
- Ciche, T. A., Kim, K. S., Kaufmann, B., Nguyen, K. C. and Hall, D. H., 2008. Cell invasión and matricide during *Photorhabdus luminescens* transmission by *Heterorhabditis bacteriophora* nematodes. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, pp. 2275-2287. <https://doi.org/10.1128/AEM.02646-07>.
- Cortez-Madrigal, H., Morales-Salvador, P. and Adams, B., 2003. Primer registro en México de *Heterorhabditis indicus* Poinar. In: Vázquez-García, M., Pérez Domínguez, J. F., Ibarra-Cortés, K. H., Balpuebla-León, C. L., Vázquez-Reyes, J. R., Cervantes-Ríos, J. y N. Ibarra-Frías, eds. Memorias del XXVI Congreso Nacional de Control Biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico, Texcoco, México. pp. 68-70.
- Delgado-Gamboa, J. R., Ruíz-Vega, J., Aquino-Bolaños, T. and Girón-Pablo, S., 2014. Revisión de nematodos entomopatógenos aislados en México. *Entomología Mexicana*, 1, pp. 284-288.
- Díaz-Maderos, P., 2002. Abundancia y distribución de especies de “gallina ciega” (Coleoptera: Melolonthidae), Hongos (Hypomycetes) y nematodos entomopatógenos en los Altos de Jalisco, México. Tesis de Maestría. Área: Biotecnología. Universidad de Colima, Tecomán, México.
- Edgington, S., Buddie A. G., Moore, D., France, A., Merino, L. and Hunt, D. J., 2011. *Heterorhabditis atacamensis* n. sp. (Nematoda: Heterorhabditidae), a new entomopathogenic nematode from the Atacama Desert. *Chile Journal of Helminthology*, 85, pp. 381-394. <https://doi.org/10.1017/S0022149X10000702>
- Erbaş, Z., Gökçe, C., Hazır, S., Demirbağ, Z., and Demir, İ., 2014. Isolation and identification of entomopathogenic nematodes (Nematoda: Rhabditida) from the Eastern Black Sea region and their biocontrol potential against *Melolontha melolontha* (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 38, pp. 187-197. <https://doi.org/10.3906/tar-1301-42>
- Fimbres, C.G. and Flores-Lara, Y., 2016. Potencialidad y retos del uso de nematodos entomopatógenos para el control biológico de plagas. Control biológico mediante una asociación simbiótica NEP-bacteria. *INVURNUS*, 11, pp. 27-36.
- Girón, P. S., Ruíz, V. L., Pérez, P. R., Sánchez, G. J. A., and Aquino, B. T., 2012. Isolation of entomopathogenic nematodes and control of *Phyllophaga vetula* Horn in Oaxaca, México. *African Journal of Biotechnology*, 11, pp. 16525-16531.
- González-Ramírez, M., 2006. Presencia, Identificación y Patogenicidad de nematodos entomopatógenos aislados de suelos del Pacífico Centro Mexicano. In: Delgado-Gamboa, J. R., Ruíz-Vega, J., Aquino-Bolaños, T., and Girón-Pablo, S., 2014. Revisión de nematodos entomopatógenos aislados en México. *Entomología Mexicana*, 1, pp. 284-288.
- Grifaldo-Alcántara, P. F., Alatorre-Rosas, R., Villanueva-Jiménez, J. A., Hernández-Rosas, F., Stock, S. P. and Ramírez-Valverde, G., 2019. Evaluación de dos cepas de nematodos entomopatógenos (Steinernematidae, Heterorhabditidae) para el control del salivazo (Hemiptera: Cercopidae) en caña de azúcar. *Nematopica*, 49, pp. 83-90.
- Grifaldo-Alcantara, P. F., Alatorre-Rosas, R., Silva-Rojas, H. V., Stock, S. P., Hernández-Rosas, F., Vargas- Madriz, H., Azuara-Domínguez, A., and Durán-Trujillo, Y., 2020. Caracterización molecular y morfométrica de *Heterorhabditis indica* (cepa CP13JA) aislado en el cultivo de caña de azúcar. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 23, #64. <https://www.revista.cceba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/view/3278/1449>
- Hasegawa M., Kishino H., and Yano T., 1985. Dating the human-ape split by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 22, pp. 160-174.
- Hominick, W.M., Reid, A.P., Bohan, D.A. and Briscoe, B. R., 1996. Entomopathogenic nematodes: biodiversity, geographical distribution and the convention on biological diversity. *Biocontrol Science Technology*, 6, pp. 317-331. <https://doi.org/10.1080/09583159631307>.
- Howlett, B.J., Brownlee, A.G., Guest, D.I., Adcock, G.J. and Mc Fadden, G. I., 1992. The 5S ribosomal RNA gene is linked to large and small subunit ribosomal RNA genes in the

- oomycetes, *Phytophthora vignae*, *P. cinnamomi*, *P. megaspera* f. sp. *glycinae* and *Saprolegnia ferax*. *Current Genetics*, 22, pp. 455-461.
<https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1601-2>.
- Joyce, S.A., Reid, A., Driver, F. and Curran, J., 1994. Application of polymerase chain reaction (PCR) methods to the identification of entomopathogenic nematodes. In: Burnell, A.M., Ehlers, R.U., and Masson, J.P., eds. *Biotechnology: Genetics of entomopathogenic nematodes bacterium complexes*. Proceedings of symposium and workshop, St Patrick's College, Maynooth, County Kildare, Ireland. Luxembourg, European Commission, DGXII. pp. 178-187.
- Kaya, H.K., Agulliera, M.M., Alumai, A., Choo, H.Y., De la Torre, M., Andras, F., Sudershan, G., Hazir, S., Lakatos, T., Pye, A., Wilson, M., Yamanaka, S., Yang, Huaiwan, Y., and Ehlers, R. U., 2006. Status of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria from selected countries or regions of the world. *Biological Control*, 38, pp. 134-155.
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.11.004>.
- Koppenhöfer, M. A., Shapiro-Ilan, D. I. and Hiltbold, I., 2020. Entomopathogenic Nematodes in Sustainable Food Production. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4, pp. 1-14.
<https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.00125>.
- Lewis, E. E., and Clarke, D. J., 2012. Nematodes Parasites and entomopathogens. In: Kaya, H. K., y Vega, F. E., eds. *Insect Pathology*. Elsevier. pp. 397-398.
- Lezama, G., Molina, J. O., Contreras, M. L. O., González, M. R., Trujillo de la L, A. and Rebolledo, O. D., 1996. Susceptibilidad de larvas de *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) a diversos nematodos entomopatógenos (Steinernematidae y Heterorhabditidae). *Vedalia*, 3, pp. 31-34.
- Lezama-Gutiérrez, R., Hamm, J. J., Molina-Ochoa, J., López-Edwards, M., Pescador-Rubio, A., González-Ramírez, M. and Styer, L. E., 2001. Occurrence of entomopathogens of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Mexican States of Michoacán, Colima, Jalisco and Tamaulipas. *Florida Entomologist*, 84, pp. 23-30.
<https://doi.org/10.2307/3496658>.
- Machado, A. R., P., Bruno, C. M., Arce, C. M., Liechti, N., Bernal, J., Bruggmann, R. and Turlings C. J. 2019. *Photorhabdus kharii* subsp. *guanajuatensis* subsp. nov., isolated from *Heterorhabditis atacamensis*, and *Photorhabdus luminences* subsp. *mexicana* subsp. nov., isolated from *Heterorhabditis mexicana* entomopathogenic nematodes. *Taxonomic Description*, 69, pp. 652-661.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003154>.
- Molina, O. J., Hamm, R., Lezama, G. L., Bojalil, F. J., Arenas, M. V. and González, M. R., 1996. Virulence of six entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) on immature stages of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Vedalia*, 3, pp. 25-30.
- Molina-Ochoa, J., Lezama-Gutiérrez, R., González-Ramírez, M., López-Edwards, M., Rodríguez-Vega, M. A. and Arceo-Palacios, F., 2003. Pathogens and parasitic nematodes associated with populations of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in México. In: Vázquez-García, M., Pérez Domínguez, J. F., Ibarra-Cortes, K., Balpuebla-León, C., Vázquez-Reyes, R., Cervantes-Ríos, J., and Ibarra-Frías, N., eds. *Memorias del XXVI Congreso Nacional de Control Biológico*. Sociedad Mexicana de Control Biológico, Texcoco, México. pp. 14-17.
- Negrete-García, R. 2013. Nematodos entomopatógenos procedentes de la rizósfera de suelos maiceros infestados con gallina ciega *Phyllophaga polyphylla*. In: Delgado-Gamboa, J. R., Ruíz-Vega, J., Aquino-Bolaños, T. and Girón-Pablo, S., 2014. Revisión de nematodos entomopatógenos aislados en México. *Entomología Mexicana*, 1, pp. 284-288.
- Nguyen, K. B., Shapiro-Ilan, D. I., Stuart, R. J., McCoy, C. W., James, R. R. and Byron J. A., 2004. *Heterorhabditis mexicana* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Tamaulipas, Mexico, and morphological studies of the bursa of *Heterorhabditis* spp. *Nematology*, 6, pp. 231-244.
<https://doi.org/10.1163/1568541041218031>.
- Nguyen, K. B., Stuart, R. J., Andalo, V., Gozel, U. and Rogers, M. E., 2007. *Steinernema texanum* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Texas, USA. *Nematology*, 9, pp. 379-396.

- Pacheco, H. M. L., Reséndiz, M. J. F., and Arriola, P. V., J., 2019. Organismos entomopatógenos como control biológico en los sectores agropecuario y forestal de México: una revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 10, pp. 4-32. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v10i56.496>.
- Poinar, G. O., 1990. Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In: Gaugler, R. and Kaya, H. K., eds. Entomopathogenic nematodes in biological. Boca Raton, FL, CRC Press. pp. 23-61.
- Ruíz, V. J., Aquino, B. T., Kaya, H. K. and Stock, P., 2003. Colecta y evaluación de nematodos entomopatógenos para el control de gallinas ciegas *Phyllophaga vetula* (Horn) en Oaxaca, México. *Folia Entomologica Mexicana*, 42, pp. 169-175.
- Shapiro-Ilan, D.I., Hazir, S., and Glazer, I., 2017. Basic and applied research: Entomopathogenic nematodes, in Lacey L.A. Ed., Microbial Control of Insect and Mite Pests: From Theory to Practice, Academic Press, San Diego, CA, pp. 91-105. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803527-6.00006-8>.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2021. Producción agrícola por cultivo y por estado. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/> 29 de septiembre 2021.
- Simard, L., Bélair, G. and Brodeur, J., 2001. Susceptibility of the European chafer (Coleoptera: Scarabaeidae) to entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae). *Journal of Nematology*, 33, pp. 297-301.
- Spiridonov, S. E., Krasomil-Osterfeld, K. and Moens, M., 2004. *Steinernema jollieti* sp. N. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from the American Midwest, *Russian Journal of Nematology*, 12, pp. 85-95.
- Stock, S. P., Rivera-Orduño, B. and Flores-Lara, T., 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, pp. 175-184. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.11.011>.
- Sturhan, D. and Mracek, Z., 2000. Comparison of the *Galleria* baiting technique and a direct extraction method for recovering *Steinernema* (Nematoda: Rhabditida) infective-stage juveniles from soil. *Folia Parasitologica*, 47, pp. 315-318.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., and Kumar S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, pp. 2725-2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>.
- Toledo, J., Gurgúa, J. L., Liedo, P., Ibarra, J. E. and Oropeza, A., 2001. Parasitismo de larvas y pupas de la mosca mexicana de la fruta *Anastrepha ludens* (Loew) (Diptera: Tephritidae) por el nematodo *Steinernema feltiae* (Filipjev) (Rhabditida: Steinernematidae). *Vedalia*, 8, pp. 27-36.
- White, G. F., 1927. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science*, 66, pp. 302-303. <https://doi:10.1126/science.66.1709.302-a>
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L. and Miller, W., 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal Computational Biology*, 7, pp. 203-214. <https://doi.org/10.1089/10665270050081478>.