



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E  
INVESTIGACIÓN**

**“EVALUACIÓN DE COMPUESTOS TIPO DAUMONA  
SOBRE LA INDUCCIÓN DE INFECTIVOS JUVENILES  
DE *Steinernema carpocapsae*”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICOBIOLOGICAS**

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

**MARÍA YANELI VELÁZQUEZ MONTES DE OCA**

**DIRECTOR: DR. ALEJANDRO TOVAR SOTO**



México, D.F.

DICIEMBRE 2009.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Nematología Agrícola del Departamento de Parasitología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. Alejandro Tovar Soto.

El sustentante fue becario Institucional del IPN y del CONACyT.

La presente investigación formó parte de los proyectos: “ESTUDIO PRELIMINAR PARA LA PRODUCCIÓN DE NEMATICIDAS A BASE DE CLAMIDOSPORAS DEL HONGO *Pochonia chlamydosporia* PARA EL CONTROL DE NEMATODOS AGALLADORES Y FORMADORES DE QUISTES EN HORTALIZAS” con clave SIP/20080553 Y “AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CEPAS NATIVAS DEL HONGO *Pochonia chlamydosporia* PARA EL MANEJO DE NEMATODOS AGALLADORES EN HORTALIZAS” con clave SIP/20091165.

**...no negaré que desde que me rayó la primera luz de la razón,  
fue tan vehemente y poderosa la inclinación a las  
letras, que ni ajenas reprensiones –que he tenido  
muchas-, ni propias reflejas –que he hecho no  
pocas-, han bastado a que deje de seguir este  
natural impulso que Dios puso en mi.**

**Sor Juana Inés de la Cruz**

## **Mi más profundo agradecimiento:**

A Dios, por darme fuerza y aliento para rodear, franquear y eliminar las piedras en el camino y resultar incólume de instigaciones.

A papi y mami, por ser fuente inagotable de amor y comprensión.

A ti cuchalet, por ser la razón de que haya llegado hasta aquí, por tu amor y complicidad, T.A. al  $\infty$  y + allá!

A Lupis, Juan y Angy, por sus consejos y franqueza.

A mis abues Lupita, Pera y Zefe donde quiera que estén, por toda su sabiduría. Julia: Cuídanos muchos años más.

Al ínclito Maestro Juan Suárez, por incluirme en el mirífico universo de los nematodos.

A Gaby, Dydy, Normis, J.C., Adrián, por su excepcional amistad.

Al Profe Rolando, por su paciencia, consideración y apoyo.

A los Doctores Alejandro Tovar, Alejandro Camacho, Benjamín Nogueta, Ricardo Alejandre y Francisco Díaz por sus aportaciones, tiempo y dedicación.

## INDICE

	Pag.
INDICE DE FIGURAS.....	iv
INDICE DE TABLAS .....	vii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT.....	x
I INTRODUCCIÓN.....	1
II ANTECEDENTES.....	3
2.1 Ubicación taxonómica.....	3
2.2 Ciclo de vida de <i>Steinernema</i> spp.....	3
2.3 Interacción <i>Steinernema</i> spp. con bacterias simbiotes.....	5
2.4 Actividad biológica ante diferentes hospederos.....	7
2.5 Producción masiva de infectivos juveniles (IJ).....	9
2.6 Aplicación en campo.....	11
2.7 Efecto de feromonas en la producción masiva de infectivos juveniles de <i>Steinernema carpocapsae</i> .....	12
III JUSTIFICACIÓN.....	16
IV OBJETIVOS.....	17
V MATERIAL Y MÉTODOS.....	18
5.1 Material biológico utilizado.....	18
5.1.1 Cepa del nematodo <i>Steinernema carpocapsae</i> .....	18
5.1.2 Cepa de la bacteria <i>Xenorhabdus nematophila</i> .....	18
5.2 Compuestos tipo daumona evaluados.....	19
5.3 Propagación “in vitro” en medio sólido de <i>Steinernema carpocapsae</i> .....	21
5.4 Sincronización y axenización de <i>Steinernema carpocapsae</i> .....	21
5.5 Cuenta directa de <i>Steinernema carpocapsae</i> .....	22

5.6 Sistemas axénicos para ensayos con compuestos tipo daumona.....	22
5.6.1 Ensayo con radiación UV para la inactivación de <i>X. nematophila</i> .....	23
5.6.2 Ensayo con antibióticos para la inactivación de <i>X. nematophila</i> .....	23
5.6.3 Ensayo con medio complejo MbmHb (medio basal modificado con hemoglobina y colesterol).....	24
5.7 Ensayos con compuestos tipo daumona.....	25
5.8 Inducción al estadio IJ del nematodo <i>S. carpocapsae</i> en un cultivo sumergido.....	26
VI RESULTADOS.....	28
6.1 Cepa de la bacteria <i>Xenorhabdus nematophila</i> .....	28
6.2 Sincronización y axenización de <i>Steinernema carpocapsae</i> .....	29
6.3 Sistema axénicos para ensayos con compuestos tipo daumona.....	31
6.3.1 Ensayo con radiación UV para la inactivación de <i>X. nematophila</i> .....	31
6.3.2 Ensayos con antibióticos para la inactivación de <i>X. nematophila</i> .....	32
6.3.3 Ensayo con medio complejo MBmHb para las pruebas con compuestos tipo daumona.....	34
6.4 Ensayos con compuestos tipo daumona.....	35
6.4.1 Ensayo con m-cresol.....	35
6.4.2 Ensayo con Ácido levulínico.....	37
6.4.3 Ensayo con LY294002.....	38
6.4.4 Ensayo con NH <sub>4</sub> <sup>+1</sup> .....	39
6.5 Pruebas de inducción al estadio de IJ del nematodo <i>S. carpocapsae</i> en cultivo sumergido.....	40

VII DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	43
VIII CONCLUSIONES.....	53
IX PERSPECTIVAS.....	54
X BIBLIOGRAFIA.....	55
XI ANEXO I.....	64



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Ciclo de vida de <i>Steinernema</i> spp. mostrando las vías alternas de desarrollo (Fuente: Modificado de Fodor, 1994).....	<b>4</b>
Figura 2.	Ciclo de vida de <i>Steinernema</i> spp. en donde se ilustra la participación de su simbionte bacteriano <i>Xenorhabdus</i> spp. (Fuente: Suárez, 1997).....	<b>6</b>
Figura 3.	Estructura química de algunas feromonas, de las que se conoce su función y procedencia. (Fuente: Miras-Portugal, 2006).....	<b>13</b>
Figura 4.	Estructura química de la daumona aislada de <i>Caenorhabditis elegans</i> (3,5-dihidroxi-6-metiltetrahidropirano-2-iloxi) (Fuente: Pan-Young <i>et al.</i> , 2005)...	<b>15</b>
Figura 5.	Estructura química de la 2-(4-Morfolinil)-8-fenil-4H-1-benzopirano-4-ona (LY294002) (Fuente: <b>Index-Merck, 1989</b> ).....	<b>19</b>
Figura 6.	Estructura química del ácido levulínico utilizado en la investigación para evaluar el efecto sobre la inducción de IJ <i>en S. carpocapsae</i> (Fuente: <b>Index-Merck, 1989</b> ).....	<b>20</b>
Figura 7.	Estructura química del m-cresol utilizado en la investigación para evaluar el efecto sobre la inducción de IJ <i>en S. carpocapsae</i> (Fuente: <b>Index-Merck, 1989</b> ).....	<b>20</b>
Figura 8.	Trampa de White con larvas de <i>G. mellonella</i> infectadas con IJ de <i>S. carpocapsae</i> .....	<b>28</b>
Figura 9.	A) Morfología colonial de la bacteria <i>X. nematophila</i> en medio NBTA. B) Morfología microscópica de <i>X. nematophila</i> teñida con la técnica de Gram....	<b>28</b>

Figura 10.	Hembra grávida de primera generación de <i>Steinernema carpocapsae</i> , obtenida de un cultivo “in vitro” de nematodos en ANGC después de 72 horas de incubación. La parte oscura muestra el útero lleno de huevos.....	<b>30</b>
Figura 11.	Huevos axénicos de <i>Steinernema carpocapsae</i> suspendidos en solución de fosfatos M2.....	<b>30</b>
Figura 12.	Obtención de juveniles J2 de <i>Steinernema carpocapsae</i> . Los huevos aislados de hembras grávidas fueron sometidos a ● uno, ■ dos y ▲ tres lavados con solución reguladora de fosfatos después de su aislamiento por un proceso de lisis alcalina. ....	<b>31</b>
Figura 13.	Inactivación de <i>X. nematophila</i> con las mezclas de los antibióticos ampicilina, estreptomycinina y gentamicina. Se observó que con mezclas de antibióticos en la concentración baja (g-a, e-a, y g-e) se obtuvo un porcentaje de fertilidad de nematodos de $10 \pm 2\%$ aproximadamente. Sin embargo, en el resto de los tratamientos se obtuvieron porcentajes de fertilidad de $31 \pm 3\%$ en promedio. Los resultados que se observan en la gráfica son el promedio de tres repeticiones para cada tratamiento.....	<b>33</b>
Figura 14.	Fotografía de los resultados obtenidos en el ensayo para la inactivación de <i>X. nematophila</i> con las mezclas de los antibióticos ampicilina, estreptomycinina y gentamicina. Se observaron algunos juveniles J2 de <i>S. carpocapsae</i> que eclosionaron y restos de los huevos que se lisaron.....	<b>33</b>
Figura 15.	Resultados del ensayo con medio MBmHb (medio basal modificado con hemoglobina mas colesterol). Se observa que en todos los pozos, se obtuvo una fertilidad entre $79 \pm 9\%$ de <i>S. carpocapsae</i> .....	<b>34</b>
Figura 16.	Fotografía de los resultados del ensayo con medio MBmHb (medio basal modificado con hemoglobina mas colesterol). Se observa que una gran cantidad ( $79 \pm 9\%$ ) de juveniles J2 eclosionaron de los huevos que se inocularon en el medio de cultivo. Además se observan algunos restos de la hemoglobina (Hb) que se adicionó y que se aglutina en el medio.....	<b>35</b>
Figura 17.	Fotografías de algunos especímenes del bioensayo con m-cresol. A) Testigo. B) Concentración baja. C) Concentración media. D) Concentración alta. Las fotografías fueron tomadas después de 24 horas de incubación.....	<b>36</b>

- Figura 18. Fotografías de algunos especímenes con ácido levulínico. A) Testigo. B) Concentración baja. C) Concentración media. D) Concentración alta. Las fotografías fueron tomadas después de 72 horas de incubación.....**37**
- Figura 19. Fotografías de algunos especímenes del bioensayo con LY294002. A) Testigo. B) Concentración baja. C) Concentración media. D) Concentración alta. Las fotografías se tomaron después de 120 horas de incubación.....**38**
- Figura 20. Fotografías de algunos especímenes del bioensayo con amonio ( $\text{NH}_4^{+1}$ ). A) Testigo. B) Concentración baja. C) Concentración media. D) Concentración alta. Las fotografías se tomaron después de 120 horas de incubación.....**39**
- Figura 21. Porcentaje de infectivos juveniles del nematodo *S. carpocapsae* en cultivo sumergido. Se observa que después de haber incubado durante ocho días el medio de cultivo, el  $74 \pm 7$  % de los nematodos que se inocularon en estadio J1 se transformaron al estadio IJ.....**41**
- Figura 22. Fotografía de algunos especímenes del bioensayo en cultivo sumergido. Se observa una doble cutícula característica de los IJ que se formaron después de 8 días de incubación en el medio de cultivo.....**41**
- Figura 23. Mediciones de pH ■ y amonio ○ en el medio de cultivo del reactor air-lift usado en el bioensayo de inducción al estadio IJ de *S. carpocapsae* en cultivo sumergido.....**42**

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Principales plagas agrícolas susceptibles a nematodos entomopatógenos en algunos cultivos (Fuente: Woust, 1991).....	<b>8</b>
Tabla 2.	Análisis comparativo de los dos sistemas de producción de infectivos juveniles de <i>Steinernema carpocapsae</i> (Rodgers <i>et al.</i> , 1992).....	<b>11</b>
Tabla 3.	Tratamientos utilizados en el ensayo con antibióticos para la inactivación de <i>X. nematophila</i> .....	<b>24</b>
Tabla 4.	Experimentos realizados con los compuestos tipo daumona (LY294002, m-cresol, ácido levulínico y $\text{NH}_4^+$ ) para observar su efecto en la inducción de estadio IJ del nematodo <i>S. carpocapsae</i> .....	<b>26</b>
Tabla 5.	Morfología colonial de la bacteria <i>X. nematophila</i> en medio NBTA.....	<b>29</b>
Tabla 6.	Tratamientos con radiación UV para la inactivación de <i>X. nematophila</i> para ensayos con compuestos tipo daumona.....	<b>32</b>
Tabla 7.	Porcentaje de formación de infectivos juveniles de <i>S. carpocapsae</i> utilizando m-cresol a tres concentraciones y realizando las lecturas cada 24 horas durante 5 días.....	<b>36</b>
Tabla 8.	Porcentaje de formación de infectivos juveniles de <i>S. carpocapsae</i> utilizando ácido levulínico a tres concentraciones y realizando las lecturas cada 24 horas durante 5 días.....	<b>37</b>

Tabla 9.	Porcentaje de formación de infectivos juveniles de <i>S. carpocapsae</i> utilizando LY294002 a tres concentraciones y realizando las lecturas cada 24 horas durante 5 días.....	<b>38</b>
Tabla 10.	Porcentaje de formación de infectivos juveniles de <i>S. carpocapsae</i> utilizando amonio ( $\text{NH}_4^{+1}$ ) a tres concentraciones y realizando las lecturas cada 24 horas durante 5 días.....	<b>39</b>
Tabla 11.	Porcentaje de formación de infectivos juveniles del nematodo <i>S. carpocapsae</i> en cultivo sumergido.....	<b>40</b>

## RESUMEN

El nematodo entomopatógeno *Steinernema carpocapsae* Filipjev ha sido probado exitosamente como agente de control de insectos-plaga que dañan cultivos de plantas de importancia económica. Este nematodo se ha logrado cultivar en una amplia gama de medios nutritivos bajo condiciones monoxénicas en compañía de su simbionte bacteriano *Xenorhabdus nematophila* Thomas y Poinar. El producto final deseado en un cultivo de nematodos entomopatógenos es la fase de infectivo juvenil (IJ), el cual será empleado para la formulación de bioinsecticidas debido a que tiene gran resistencia a las condiciones ambientales adversas y es la única fase capaz de localizar y penetrar en el insecto activamente. La limitante principal en un sistema de producción masiva es el tiempo de aparición de los infectivos juveniles (IJ) lo que encarece significativamente el producto. El presente trabajo tiene los siguientes objetivos: 1) Evaluar el efecto de los compuestos *m*-cresol, ácido levulínico, LY294002 y amonio sobre el porcentaje y tiempo de aparición de la fase de infectivo juvenil (IJ) del nematodo entomopatógeno *Steinernema carpocapsae*. 2) Evaluar la inducción de infectivos juveniles de *S. carpocapsae* en un cultivo líquido monoxénico. Para lograr el primer objetivo, se utilizó Medio de cultivo MBmHb el que se inoculó con *S. carpocapsae* en estadio J1, posteriormente se agregaron los compuestos *m*-cresol, ácido levulínico, LY294002 y amonio a las concentraciones baja, media y alta. Se contó diariamente durante 5 días el porcentaje de IJ en el microscopio óptico. Para el segundo objetivo se utilizó un reactor air-lift con Medio YS + colesterol, se inoculó con 5% de un cultivo de *X. nematophila* en fase log y se incubó a 25°C durante 24 h. En seguida se agregó *S. carpocapsae* en fase IJ. Cada 24 h se tomó una alícuota del mosto de fermentación del reactor, se eliminaron los nematodos inicialmente inoculados mediante filtración y el medio de cultivo filtrado se inoculó inmediatamente *S. carpocapsae* en estadio J1. Diariamente se realizó una cuenta con ayuda de un microscopio óptico. Los resultados indican que los compuestos *m*-cresol, ácido levulínico, LY294002 y amonio a ninguna de las concentraciones probadas indujeron el estadio IJ del nematodo *S. carpocapsae*. Sin embargo resulta interesante que el ácido levulínico, al contrario de inducir el estadio IJ, promovió el desarrollo del nematodo en un tiempo más corto que el testigo. Por su parte en el cultivo líquido monoxénico, se observó la aparición de IJ después de 5 días; aunque fue máxima entre el día 8 y 9, en donde el  $74 \pm 7$  % de los nematodos se transformaron a IJ. Esto indica que el medio de cultivo en donde creció *previamente S. carpocapsae* contiene probablemente algún producto que sirve como señal química, lo que provoco la inducción en pocos días de los IJ de este nematodo.

## ABSTRACT

The entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* Filipjev has been successfully tested as a control agent of insect pests that damage crops of plants of economic importance. This nematode has managed to cultivate in a wide range of nutrient media under monoxenic conditions in the company of their bacterial symbiont *Xenorhabdus nematophila* Thomas and Poinar. The final product in a culture of entomopathogenic nematodes is the infective juvenile stage (IJ), which will be used for the formulation of bio-insecticides because it has great resistance to adverse environmental conditions and is the only phase able to locate and penetrate actively in the insect. The main constraint in a mass production system is the time of transformation to the infective juveniles (IJ) which increases significantly the product. This investigation has the following objectives: 1) evaluate the effect of the compounds *m*-cresol, levulinic acid, LY294002 and ammonium on the percentage and time of transformation to infective juvenile stage (IJ) of entomopathogenic nematode *S. carpocapsae*. 2) Evaluate the induction of infective juveniles of *S. carpocapsae* in liquid monoxenic culture. To achieve the first objective, we used culture medium MBmHb which was inoculated with J1 stage of *S. carpocapsae*, later additions of the compounds *m*-cresol, levulinic acid, LY294002 and ammonium in low, medium and high concentrations. The percentage of IJ was counted daily for 5 days in the optical microscope. For the second objective was used an air-lift reactor with culture medium YS + cholesterol, inoculated with 5% of *X. nematophila* in log phase and it was incubated at 25 ° C for 24 h. Then it was added IJ stage of *S. carpocapsae*. Every 24 h an aliquot was taken from the air-lift reactor. The nematodes that it was inoculated initially, it was removed by filtration and the filtered culture medium was inoculated immediately with J1 stage of *S. carpocapsae*. Daily account was performed using an optical microscope. The results indicate that the compounds *m*-cresol, levulinic acid, LY294002 and ammonium to any of the tested concentrations induced the IJ stage of the nematode *S. carpocapsae*. However it is interesting that levulinic acid, contrary to induce IJ stage, promoted the development of the nematode in a shorter time than the control. For his part in monoxenic liquid culture, we observed the appearance of IJ after 5 days, but was maximal between day 8 and 9, where 74 + 7% of nematodes were transformed to IJ. This indicates that the culture medium in which previously grew *S. carpocapsae* probably contains a product that serves as a chemical signal, which caused the induction of the IJ in a few days in this nematode.

## I. INTRODUCCIÓN

Los nematodos entomopatógenos *Steinernema* spp. han sido aislados en muchas regiones del mundo; estos afectan selectivamente a una gran cantidad de insectos plaga de los cultivos agrícolas, sin dañar a mamíferos ni a plantas (**Georgis, 1990; Klein, 1990; Georgis y Hage, 1991**). La muerte rápida de los insectos a los que afecta y la amplia gama de hospederos de estos nematodos ha generado gran interés para utilizarlos como agentes de control biológico en los sistemas agrícolas para el manejo de plagas. *Steinernema carpocapsae* Filipjev es una de las especies de nematodos entomopatógenos más promisorias a nivel mundial para el control de una gran cantidad de plagas que causan serios daños en la agricultura (**Woust, 1991**).

*Steinernema carpocapsae* se ha logrado cultivar en una amplia gama de medios nutritivos bajo condiciones monoxénicas en compañía de su simbionte bacteriano *Xenorhabdus nematophila* Thomas y Poinar. El producto final deseado en un cultivo de nematodos entomopatógenos empleado para la formulación de un bioinsecticida es la fase de infectivo juvenil (IJ), debido a tiene gran resistencia a las condiciones adversas y es la única fase capaz de localizar y penetrar activamente en la fase de larva del insecto (**Golden y Riddle, 1984a**).

Existen varias formulaciones de nematodos entomopatógenos en el mercado. *S. carpocapsae* actualmente se produce a gran escala mediante dos métodos principalmente, “in vivo” e “in vitro”, en el primero se emplean larvas del insecto *Galleria mellonella* L.; sin embargo, este método de producción tiene la desventaja de que necesita una gran cantidad de larvas del insecto para su reproducción (**Kaya y Gaugler, 1993**).



Otra forma de producir este antagonista es utilizando medios artificiales con la incorporación posterior de su simbiote; la limitante principal en este sistema de producción masiva es el tiempo de aparición del infectivo juvenil (IJ) lo que encarece significativamente los productos (Soler *et al.*, 2003).

En la década de los 80's se aisló por primera vez un compuesto tipo feromona, llamado "daumona" (Popiel y Hominick, 1992) encontrado en los cultivos masivos de medios agotados del nematodo *Caenorhabditis elegans* Maupas, el que posteriormente fue capaz de inducir en corto tiempo la formación de infectivos juveniles en *S. carpocapsae* (Golden y Riddle, 1982). En años recientes se han sintetizado compuestos con estructura similar a la daumona de *C. elegans*, los que también inducen la formación de IJ en un tiempo relativamente corto (Pan-Young *et al.*, 2005). Hipotéticamente se piensa que los nematodos entomopatógenos como *S. carpocapsae* y otros más, también producen compuestos tipo daumona cuando el medio artificial en el que se reproducen se agota. Entonces existe la posibilidad de realizar bioensayos en los que se adicionen compuestos con estructura similar a la daumona de *C. elegans* para inducir la formación de IJ de *S. carpocapsae*, o bien productos de excreción de los nematodos o compuestos que sean detectados como señales negativas con el fin de acortar así el tiempo de producción de un bioinsecticida a base de este nematodo, con el fin de disminuir los costos de producción de estos productos.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Ubicación taxonómica

*Steinernema carpocapsae* se encuentra clasificado actualmente de la siguiente manera (Maggenti, 1981):

<b>Phylum</b>	Nematoda
<b>Clase</b>	Secernentea
<b>Orden</b>	Rhabditida
<b>Suborden</b>	Rhabditina
<b>Superfamilia</b>	Rhabditoidea
<b>Familia</b>	Steinernematidae
<b>Género</b>	<i>Steinernema</i>
<b>Especie</b>	<i>S. carpocapsae</i>

### 2.2 Ciclo de vida *Steinernema* spp.

El ciclo de vida de *S. carpocapsae* presenta varias fases importantes de desarrollo: el huevo, 4 estadios juveniles (J1-J4) y el adulto (hembra y macho) (Figura 1) (Chitwood y Chitwood, 1974). La hembra grávida deposita los huevos en el medio que la rodea, el estadio juvenil (J1) usualmente experimenta una muda dentro del huevo y emerge de él la forma juvenil de segundo estadio (J2).

Los nematodos entomopatógenos producen formas resistentes, las cuales se designan como “juveniles resistentes”, “resistentes”, “infectivos juveniles”, “larvas dauer”, o “IJ”. Las formas juveniles resistentes son el tercer estadio del nematodo (J3) y usualmente se encuentran encapsuladas en la cutícula del segundo estadio. El infectivo juvenil (IJ) es la única fase que busca activamente a las fases larvianas de los insectos hospederos o puede esperar a que un hospedero adecuado entre a su hábitat (Poinar, 1990). La fase IJ del nematodo es un estadio de vida libre, es decir, puede sobrevivir en el suelo fuera del hospedero. En los steinernemátidos, cuando el IJ alcanza el interior de un insecto, se desarrolla rápidamente hasta alcanzar el estadio J4 (pre adulto). La madurez completa de adultos bien diferenciados se tiene a las 48-72 horas desde la oviposición. Después de la copula las hembras grávidas ovipositan, y luego liberan los juveniles (J2) en menos de 96 hrs. Estas fases juveniles repiten el ciclo de desarrollo y reproductivo si es que cuentan con suficiente alimento (Figura 1, línea continua) (Fodor, 1994).

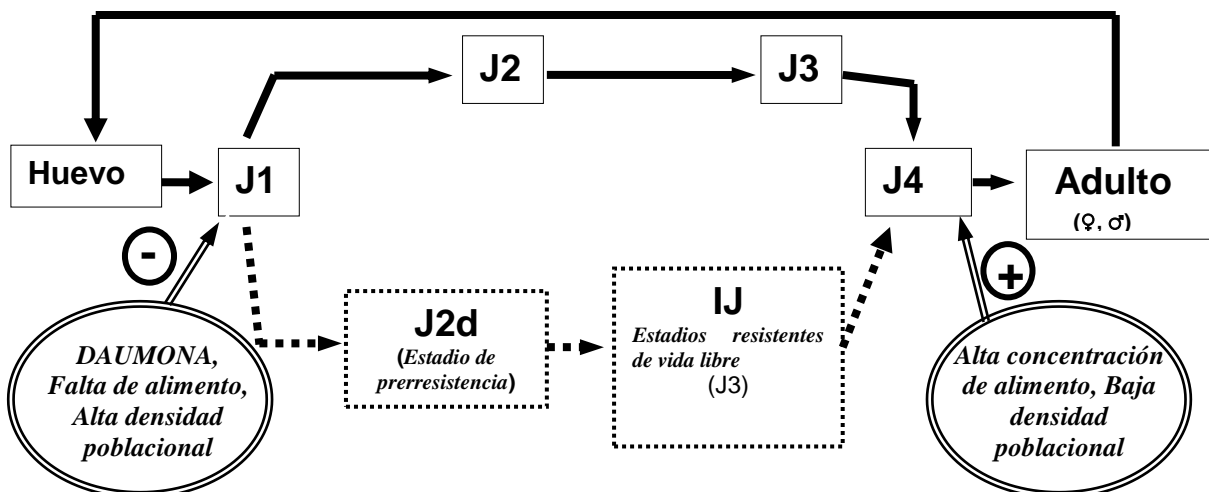


Figura 1. Ciclo de vida de *Steinernema* spp. mostrando las vías alternas de desarrollo (Fuente: Modificado de Fodor, 1994).

La formación de larvas dauer (IJ) es inducida por señales de naturaleza química tales como feromonas presentes en el medio ambiente, así como una alta cantidad de nematodos, lo que hace que la concentración de los productos de desecho, principalmente amonio ( $\text{NH}_4^{+1}$ ) se vea aumentada en el medio ambiente en donde se encuentran los nematodos (**Weinstein, 1960; Wright y Newall, 1976**). Estas señales intervienen para que el nematodo siga otra ruta. Haciendo caso a dichas señales, es que *Steinernema* detecta que el medio ambiente ya no es favorable y después de eclosionar el J2 continúa su desarrollo a un estadio juvenil de pre resistencia (J2d), para transformarse finalmente en un organismo de resistencia IJ (Figura 1). El IJ abandona el cadáver de su hospedero, iniciando una vez más un periodo de vida libre en donde busca otro hospedero en el que pueda volver a repetir su ciclo. La causa de la transformación en fases juveniles de resistencia IJ, es entonces aparentemente, la alta densidad poblacional de nematodos, relacionándose además con la presencia de un compuesto tipo feromona (daumona) y la baja cantidad de nutrientes disponibles en el cadáver (**Kaya y Simmann, 1987; Popiel et al., 1989**).

### **2.3 Interacción *Steinernema* spp. con bacterias simbióticas**

Cuando un infectivo juvenil (IJ) de *Steinernema* spp. localiza un insecto hospedero, logra la infección penetrando al interior del mismo por las aberturas naturales, como la boca, el ano o los espiráculos, aunque esta última vía de entrada no parece factible (**Poinar y Himsforth, 1967; Ishibashi y Kondo, 1990**). El nematodo penetra mecánicamente hasta el hemocele del insecto y una vez ahí libera a su simbionte bacteriano, *Xenorhabdus* spp. que de manera natural se encuentra en una estructura del esófago llamada estructura intravesicular (**Mahar et al., 2005**). La bacteria liberada prolifera y causa la muerte del insecto por septicemia en 24-48 horas, estableciendo condiciones de desarrollo favorables para el nematodo, debido a la lisis

de los tejidos del hospedero y a la inhibición de otros microorganismos por la liberación de algunos antibióticos (Maxwell *et al.*, 1993). Al morir el hospedero, los nematodos se reproducen pasando por varias generaciones (Figura 2). Eventualmente las formas infectivas del nematodo llevando en su intestino a células de *Xenorhabdus* spp., emergen del cadáver del insecto. En ensayos “in vivo” realizados en el laboratorio, se ha observado la salida de IJ del cadáver del hospedero, entre 8 y 14 días después de la infección. Los infectivos juveniles pueden permanecer vivos por un largo periodo en el suelo, y bajo condiciones de laboratorio, algunos pueden vivir incluso por cinco años (Suárez, 1997).

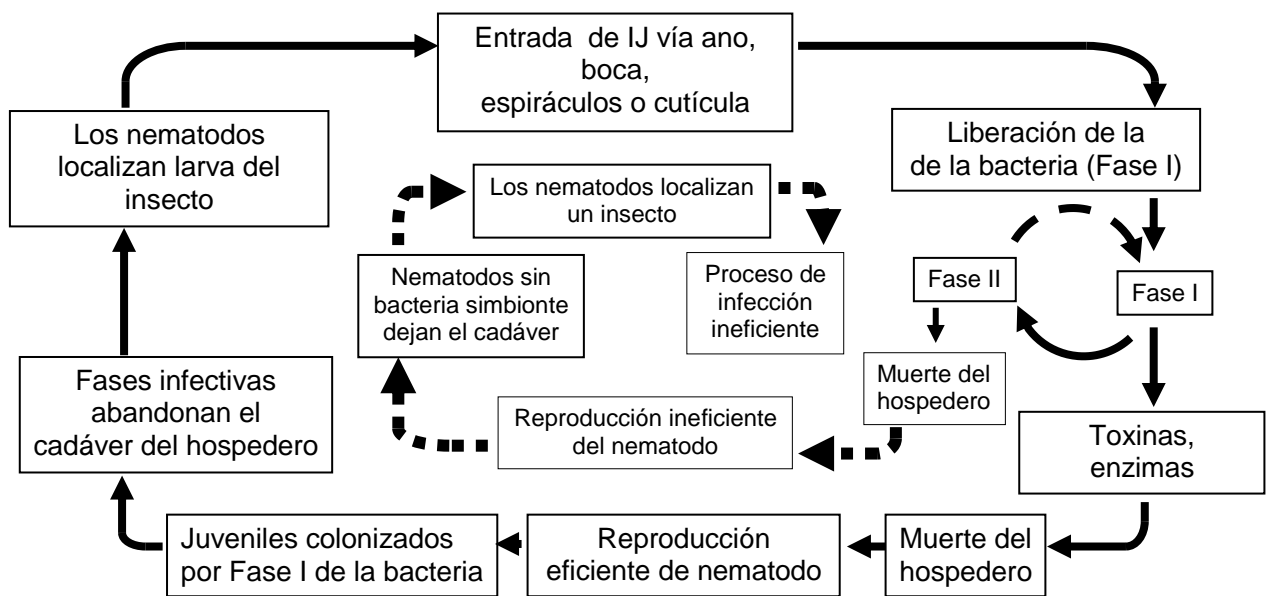


Figura 2. Ciclo de vida de *Steinernema* spp. en donde se ilustra la participación de su simbiote bacteriano *Xenorhabdus* spp. (Fuente: Suárez, 1997).

La bacteria *Xenorhabdus* spp. presenta dos fases, designadas como: fase I (forma primaria) y fase II (forma secundaria) (Akhurst, 1980, 1982; Akhurst y Boemare, 1986; Brehélin *et al.*, 1992; Latha y Chang, 1993; Leisman *et al.*, 1995; Volgyi *et al.*, 1998). La fase primaria es

aislada de nematodos infectivos y tiende a ser inestable, pasando rápidamente a la fase II. La fase secundaria es aislada de cadáveres viejos de insectos o de cultivos de nematodos “in vitro”. Las diferencias entre las dos fases de la bacteria pueden ser detectadas por pruebas bioquímicas y por la producción de metabolitos, además de la facultad de soportar la reproducción eficiente de nematodos “in vitro” que se logra cuando esta presente la fase primaria (**Woodring y Kaya, 1988; Akhurst y Boemare, 1990**).

#### **2.4 Actividad biológica ante diferentes hospederos**

Los nematodos entomopatógenos tienen una amplia gama de hospedantes son capaces de atacar a más de 200 especies de insectos, de muchos órdenes, aunque existe preferencia de algunas especies de nematodos por algunos insectos en particular (**Bedding 1981, 1984; Woust, 1991; Kaya y Gaugler, 1993**).

La Tabla 1 muestra la lista de las principales especies de insectos en algunos cultivos importantes, que son susceptibles a estos nematodos.

Tabla 1. Principales plagas agrícolas susceptibles a nematodos entomopatógenos en algunos cultivos (Fuente: **Woust, 1991**).

CULTIVO		PLAGA	
Nombre científico	Nombre común	Nombre científico	Nombre común
<i>Musa acuminata</i> Colla	Plátano	<i>Cosmopolites sordidus</i> Germ.	Gorgojo negro del plátano
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Frijol	<i>Diabrotica</i> spp. Ger.	Tortuguilla
<i>Citrus limonum</i> Risso	Cítricos	<i>Pachnaeus litus</i> Germar	Picudo de los cítricos
<i>Coffea arabica</i> L.	Café	<i>Hypothenemus hampei</i> Ferr	Broca del grano del cafeto
<i>Zea mays</i> L.	Maíz	<i>Spodoptera exigua</i> Hubner	Rosquilla verde
<i>Gossypium herbaceum</i> L.	Algodón	<i>Pectinophora gossypiella</i> Saund.	Rosada del algodonoero
<i>Prunus persica</i> L.	Frutales	<i>Ceratitis capitata</i> Wiedmann	Mosca de la fruta
<i>Arachis hypogaea</i> L.	Cacahuete	<i>Elasmopalpus lignosellus</i> Zeller	Zancudo del ajonjolí
<i>Solanum tuberosum</i> L.	Papa	<i>Leptinotarsa decemlineata</i> Say	Escarabajo de la papa
<i>Oriza sativa</i> L.	Arroz	<i>Chilo</i> spp. Smith	Barrenador del arroz
<i>Beta vulgaris</i> L.	Remolacha	<i>Leptinotarsa decemlineata</i> Say	Escarabajos de la remolacha
<i>Saccharum officinarum</i> L.	Caña de azúcar	<i>Diatraea saccharalis</i> F., <i>Diaprepes abbreviatus</i> L.	Talador de la caña de azúcar, Vaquita de la caña
<i>Ipomoea batatas</i> L.	Camote	<i>Cylas formicarius</i> F.	Gorgojo del camote
<i>Physalis</i> sp. L.	Tomate	<i>Spodoptera</i> spp. Smith	Orugas
<i>Brassica oleracea</i> L.	Col	<i>Plutella xilostella</i> L.	Palomilla de dorso diamante
<i>Chrysanthemum</i> sp. L	Ornamentales	<i>Otiorhynchus sulcatus</i> Aeonium	Gorgojo

## 2.5 Producción masiva de infectivos juveniles (IJ)

Existen dos métodos para la producción de IJ de *S. carpocapsae*; el método “in vivo” y el método “in vitro”, este último se puede desarrollar en cultivo sólido o en cultivo líquido. El método “in vivo” presenta algunas desventajas ya que requiere de un gran número de larvas del insecto *G. mellonella* (Ehlers y Strauch, 1994), es difícil su escalado, ya que sólo se pueden producir en larvas de cuarto instar del insecto y éstas presentan un tamaño similar; además se dificulta su control de calidad; la uniformidad de materiales es pobre ya que la cantidad de IJ que se obtienen de una larva a otra es variable en función del tamaño y el estado general de la larva; sin embargo, su costo de producción es bajo y los IJ se obtienen en menos tiempo comparado con el método “in vitro”. El método “in vitro” tiene la ventaja de ser de fácil escalado ya que se puede pasar de un recipiente pequeño a otro de mayor tamaño para aumentar la producción; con este método se puede realizar un mejor control de calidad y la uniformidad de materiales es buena ya que los fermentadores utilizados poseen siempre un sistema de homogenización; aunque este método de producción es más costoso y los IJ se obtienen hasta después de 20 días en promedio. La necesidad de hacer más económica y productiva la obtención de los IJ hizo que surgiera la producción en cultivo sólido. Los factores importantes en este cultivo son: que este sea monoxénico (que los nematodos y su bacteria asociada sean los únicos agentes bióticos presentes en el medio de cultivo), es necesario utilizar a la bacteria en su forma primaria, se necesita una superficie grande para que los nematodos puedan crecer; además de una fuente de esterol para los nematodos y una base alimentaria para la bacteria. El método más utilizado para la producción de IJ es el de Bedding (1984) que utiliza un medio con vísceras de pollo en placas de poliuretano y frascos grandes de vidrio o bolsas que pueden ser procesadas en la autoclave. Este proceso puede ser



semiautomatizado, aunque sus críticos le señalan problemas en la estabilidad de producción, por la consistencia de los materiales usados y la facilidad con la que se contaminan. El método "in vitro" de producción por fermentación líquida usando cultivos monoxénicos de nematodos, el cual es el foco principal de atención de la producción comercial a gran escala. Este método tiene muchos aspectos positivos, aunque por ser objeto de patentes por parte de las firmas comerciales, la información está restringida. Así tenemos que los cultivos "in vitro" en medio líquido son de escalado fácil, confiables, emplean materiales estables y uniformes; sin embargo, se conoce que la producción de steinernematidos está más adelantada y se obtienen de forma relativamente sencilla, usando fermentadores de 80 mil litros (**Rodgers et al., 1992**).

Las fermentaciones para obtener IJ realizan dos procesos simultáneos, la producción de nematodos y el desarrollo de la bacteria asociada, la que se inocular en un momento dado del desarrollo de la fermentación. En este proceso se utilizan medios de cultivo a base de riñones y extractos de levadura o medios conteniendo harina de soya, extracto de levadura, aceite de maíz y yema de huevo, los cuales llegan a producir rendimientos altos como 100 000 infectivos juveniles/ml (**Chavarría et al., 2006**).

La tabla 2 presenta un análisis comparativo entre los sistemas de producción, lo cual permite observar las ventajas y desventajas de cada uno de los métodos de producción dependiendo de los propósitos y recursos disponibles (**Rodgers et al., 1992**).

Tabla 2. Análisis comparativo de los dos sistemas de producción de infectivos juveniles de *Steinernema carpocapsae* (Rodgers *et al.*, 1992).

Indicador	In vivo	In vitro	
		Cultivo sólido	Cultivo líquido
Rendimiento aproximado	4 x 10 <sup>5</sup> /insecto	6.7 x 10 <sup>8</sup> /Kg	1 x 10 <sup>8</sup> /litro
Duración del proceso (días)	8 a 15	14 a 28	16 a 24
Costos en capital	bajo/medio	bajo/medio	alto
Costos labor	alto	alto	bajo
Costo del material base	alto	bajo	bajo
Control de calidad	difícil	difícil	menos difícil
Control de la variación de la fase de la bacteria	pobre	pobre	bueno
Escalado	difícil	difícil	bueno
Control de materiales base y posibilidades de suministro	pobre	medio	bueno
Uniformidad de materiales base	pobre	pobre	bueno

## 2.6 Aplicación en campo

Se han utilizado diversos métodos de aplicación de nematodos entomopatógenos dependiendo del hospedante y de las condiciones ambientales, está establecido que aquel método seleccionado debe distribuir los nematodos lo más cerca posible del insecto a controlar en ambientes donde los nematodos puedan sobrevivir el tiempo necesario para infectar (Rodgers *et al.*, 1992).

Los nematodos pueden ser aplicados con el equipo común de agroquímicos incluyendo aspersores pequeños de presión, electrostáticos de ventilador y helicópteros. Los steinernematidos y heterorhabditidos pueden resistir presiones de aplicación de 300 lb/plg<sup>2</sup> y ser liberados con aspersores comunes con aberturas de 50 µm; sin embargo, algunos equipos de aspersión producen una elevada cantidad de calor, temperaturas por encima de los 32°C, lo que podría afectar adversamente a los nematodos (**Georgis y Gaugler, 1991; SAGAR, 1999**).

Entre los métodos de aplicación en campo destacan:

- Uso de cadáveres de insectos infectados
- Jeringuillas
- Pistilos de mano
- Motas de algodón sumergidas en soluciones de nematodos
- Aspersores de mano y automáticas
- Por los sistemas de irrigación
- Aplicándolos con fertilizantes líquidos
- Aspersores normales de insecticidas

## **2.7 Efecto de feromonas en la producción masiva de infectivos juveniles de *Steinernema carpocapsae***

Las feromonas son mensajeros químicos especie específicos. Algunos animales liberan sustancias químicas en su entorno para influenciar el comportamiento o fisiología de los miembros de la misma especie. Estos compuestos juegan un importante papel en el comportamiento sexual y social, así como en la fisiología reproductiva de muchas especies de mamíferos, insectos, nematodos y otros. Descubrir la naturaleza de estas sustancias, así como

la estructura de sus receptores y los mecanismos de señalización ha sido un reto científico, muchos de estos puntos están todavía sin resolver. La naturaleza química de las feromonas es muy diversa y se conoce una mínima parte, algunas son volátiles y suelen liberarse asociadas a proteínas denominadas lipocalinas, abundantes en la orina de mamíferos, o en otras secreciones, como el sudor y la saliva (Figura 3) (Miras-Portugal, 2006).



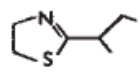

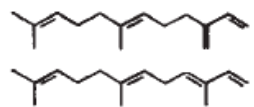
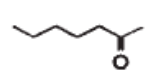
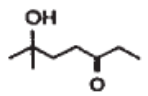
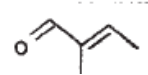

<b>Bombykol</b>		<b>Mariposa de la seda-</b>	<b>Atracción del macho</b>
<b>2,5-dimetilpiracina</b>		<b>Orina de ratón hembra-</b>	<b>Retraso de la pubertad</b>
<b>2-sec-butil-4,5-dihidrotiazol</b>		<b>Orina y vejiga de ratón macho-</b>	<b>sincronización del estro y aceleración de la pubertad.</b>
<b>2,3-dehidro-exo-brevicomina</b>		<b>Orina y vejiga de ratón macho-</b>	<b>sincronización del estro y aceleración de la pubertad</b>
<b><math>\alpha</math>- y <math>\beta</math>-farnesenos</b>		<b>Glándula prepuccial del ratón-</b>	<b>Aceleración de la pubertad.</b>
<b>2-heptanona</b>		<b>Orina de ratón macho y hembra-</b>	<b>ampliación del estro.</b>
<b>6-hidroxi-6-metil-3-heptanona</b>		<b>Orina y vejiga de ratón macho-</b>	<b>aceleración de la pubertad</b>
<b>2-metilbut-2-enal</b>		<b>Leche de coneja-</b>	<b>Localización del pezón materno</b>
<b>11-Hexadecenyl acetato</b>		<b>Polilla de la col</b>	<b>(<i>Plutella xylostella</i>)</b>

Figura 3. Estructura química de algunas feromonas, de las que se conoce su función y procedencia. (Fuente: Miras-Portugal, 2006).

*Caenorhabditis elegans* es el modelo biológico para nematodos, mucho se ha estudiado en relación con este organismo; Golden y Riddle (1984a), realizaron estudios con la feromona inductora de los IJ de este nematodo, a esta feromona le llamaron **daumona** por ser la responsable de inducir el estadio dauer o IJ. En *C. elegans* los IJ se forman a partir de los juveniles J2 por una apropiada combinación de señales químicas y ambientales (poco alimento, alta densidad poblacional) lo que desencadena la producción de una feromona inductora de esta fase (IJ). En este nematodo la concentración de daumona se ha utilizado para medir la cantidad de nematodos presentes en un medio de cultivo.

En el trabajo de Golden y Riddle (1984b), se concluyó que la daumona estudiada es químicamente estable, no volátil con naturaleza química similar a la de los ácidos grasos; la adición de este compuesto a una concentración de 50µL/2mL de agar, y usando una concentración controlada de la bacteria *Escherichia coli* Theodore Escherich se induce la formación de IJ.

Por su parte Babar *et al.* (1999) estudiaron el efecto de la 2-(4-morfolinil)-8-fenil-4H-1-benzopirano-4-ona conocida comercialmente como LY294002 en los estadios J1 y J2 de *C. elegans* y analizaron los efectos producidos en el desarrollo a diferentes temperaturas. Este compuesto tuvo efecto en el primer estadio larvario e indujo la formación del estadio dauer. El LY294002 se inoculó en la superficie del agar en una caja de Petri. Ellos encontraron que una concentración mayor a 160 µL del producto a 35°C indujo la formación del estadio dauer. Además se observó que una concentración 2.4mM indujo la transformación al estadio dauer de aproximadamente el 50% de los nematodos al cabo de 72 horas a 27°C.

Pan-Young *et al.* (2005) aislaron la daumona natural de *C. elegans* (Figura 4) mediante la purificación del medio de cultivo en el que se desarrollo el nematodo a gran escala y sintetizaron químicamente esta molécula; ellos encontraron que la estructura química tiene naturaleza similar a la de los ácidos grasos. Además, dichos investigadores realizaron otros experimentos en los que en una placa de Petri conteniendo medio de cultivo para nematodos (NGM) adicionaron una solución alcohólica de la daumona, natural y sintética a una concentración de 320  $\mu\text{L}$  en 300  $\mu\text{L}$  de alcohol, además adicionaron 160  $\mu\text{L}$  de una suspensión de *E. coli* OP50 inactivada mediante calor a 95°C durante 30 min. Dejaron que las soluciones se absorbieran e inocularon 5 adultos de *C. elegans*, incubaron las placas a 20°C de 4 a 6 horas, después de este tiempo de incubación retiraron los adultos para que en la placa únicamente quedaran los huevos, continuaron incubando de 52 a 72 horas y adicionaron 1 mL de una solución de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 1 %. Los nematodos que sobrevivieron a este tratamiento se consideraron estadios dauer, ya que en este nematodo no existe una estructura que permita la identificación física de los estadios dauer de manera que es necesario llevar a cabo este tratamiento con SDS para identificar la fase. De esta forma demostraron, que tanto la daumona natural, como la sintética indujeron la formación del estadio dauer en *C. elegans*.

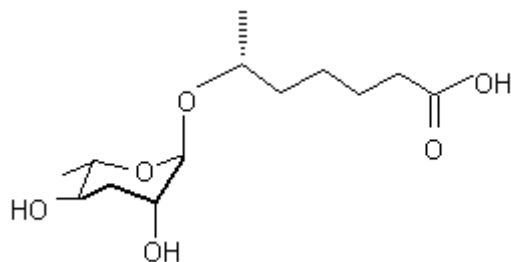


Figura 4. Estructura química de la daumona aislada de *Caenorhabditis elegans* (3,5-dihidroxi-6-metiltetrahidropirano-2-iloxi) (Fuente: **Pan-Young *et al.*, 2005**).

### III. JUSTIFICACIÓN

Los bioinsecticidas a base del nematodo entomopatógeno *Steinernema carpocapsae* utilizados en la actualidad para el control de plagas agrícolas, requieren necesariamente para su formulación la producción a gran escala de la fase de infectivo juvenil (IJ); una limitante para obtener esta fase es el alto costo de producción debido al tiempo de producción de esta fase, aproximadamente de 20 días. Los antecedentes en la literatura hacen suponer que compuestos con estructura química semejante a la daumona de *C. elegans*, productos finales del metabolismo de los nematodos o bien, compuestos que éstos detecten como señales negativas en el medio de cultivo, pudieran tener efecto al acortar el tiempo de inducción de la fase (IJ) en *S. carpocapsae*; lo que abarataría el costo de producción.

## IV. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de compuestos tipo daumona y la adición de un medio de cultivo monoxénico agotado sobre el tiempo de aparición del estadio infectivo juvenil en el nematodo entomopatógeno *Steinernema carpocapsae*.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Evaluar el efecto de los compuestos LY294002, ácido levulínico, *m*-cresol y  $\text{NH}_4^{+1}$  sobre el porcentaje y tiempo de aparición de la fase de infectivo juvenil (IJ) del nematodo entomopatógeno *Steinernema carpocapsae*.

b) Evaluar el efecto de la adición de un cultivo monoxénico agotado sobre el porcentaje y tiempo de aparición de la fase de infectivo juvenil (IJ) del nematodo entomopatógeno *Steinernema carpocapsae*.



## V. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1 Material biológico utilizado

#### 5.1.1 Cepa del nematodo *Steinernema carpocapsae*

La cepa del nematodo entomopatígeno *Steinernema carpocapsae* utilizada en este trabajo fue donada por la Colección de Microorganismos Entomopatógenos del Instituto de Fitosanidad. Laboratorio de Patología de Insectos, del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, en el Estado de México. Esta cepa se mantiene en agua destilada estéril a 4°C.

#### 5.1.2 Cepa de la bacteria simbiote *Xenorhabdus nematophila*

Esta bacteria se aisló de larvas del insecto parásito de apiarios *Galleria mellonella*, después de haber sido infectada con el nematodo *S. carpocapsae* según la siguiente metodología.

Las larvas de *Galleria mellonella* se obtuvieron de un apiario parasitado con este insecto, ubicado en el municipio de Tlatlaya, Estado de México. Se seleccionaron las larvas más grandes para lograr una producción eficiente de nematodos; después se sometieron a choque térmico para impedir la formación de capullos durante la infección con nematodos. Posteriormente se colocaron cinco larvas en una trampa de White y se infectaron con *S. carpocapsae* a una concentración de 20 IJ/larva. Después de 48 horas de iniciada la infección, se tomó una de las larvas en condiciones de esterilidad para obtener una muestra de hemolinfa; la que se sembró en agar nutritivo adicionado con azul de bromotimol y cloruro de trifeniltetrazolio (NBTA) con el fin de aislar a la bacteria *X. nematophila*.

Finalmente la identificación de la bacteria se efectuó mediante la morfología microscópica realizando tinción de Gram, morfología colonial y reproducción eficiente del nematodo (Woodring y Kaya, 1988).

Para conservar la cepa de *X. nematophila*, una colonia aislada fase I se transfirió a 100 mL de medio basal (MB) (Anexo I) y se incubó en la oscuridad a 30 °C con agitación constante de 200 rpm durante 24 horas. Al cultivo se le adicionó glicerol hasta una concentración de 17% (v/v), la mezcla se homogeneizó y se distribuyó en alícuotas de 1 mL en tubos Eppendorf. Los tubos se congelaron inmediatamente a -20 °C por 12 horas y se ultracongelaron a -70 °C (Suarez, 2002).

## 5.2 Compuestos tipo daumona evaluados

### a) 2-(4-Morfolinil)-8-fenil-4H-1-benzopirano-4-ona (LY294002)

Se evaluó el compuesto 2-(4-Morfolinil)-8-fenil-4H-1-benzopirano-4-ona (LY294002) (Figura 5) debido a que se ha utilizado para inducir el estadio de resistencia del nematodo *C. elegans*, de forma que este compuestos actúa como una daumona; y dado que *S. carpocapsae* está emparentado filogenéticamente con *C. elegans* se usó el compuesto para verificar su efecto en el nematodo estudiado.

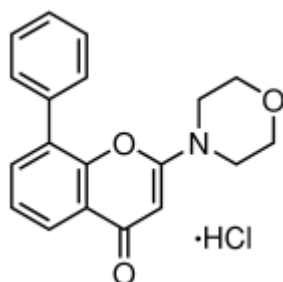


Figura 5. Estructura química de la 2-(4-Morfolinil)-8-fenil-4H-1-benzopirano-4-ona (LY294002) (Fuente: **Index-Merck, 1989**).

### b) **Ácido levulínico**

El ácido levulínico (Figura 6) se propone en esta investigación como posible compuesto con actividad parecida a una daumona debido a que presenta estructura química similar a la daumona aislada de *Caenorhabditis elegans* (3,5-dihidroxi-6-metiltetrahidropirano-2-iloxi) por Pan-Young y sus colaboradores en el 2005.

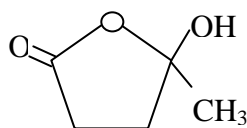


Figura 6. Estructura química del ácido levulínico utilizado en la investigación para evaluar el efecto sobre la inducción de IJ en *S. carpocapsae* (Fuente: **Index-Merck, 1989**).

### c) **m-cresol**

El m-cresol (Figura 7) es un compuesto que comúnmente se encuentra en el suelo ya que es usado como plaguicida, de manera que este podría ser una de las señales negativas que detecte el nematodo en el medio ambiente y desvíe su desarrollo hacia la fase de resistencia (IJ).

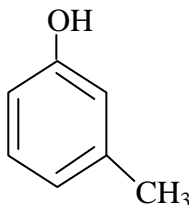


Figura 7. Estructura química del m-cresol utilizado en la investigación para evaluar el efecto sobre la inducción de IJ en *S. carpocapsae* (Fuente: **Index-Merck, 1989**).

#### **d) Amonio ( $\text{NH}_4^{+1}$ )**

Por otra parte se utilizó el amonio ( $\text{NH}_4^{+1}$ ), ya que es un producto de excreción de los nematodos y constituye entre 40-90 % del nitrógeno no proteico (**Wright, 1998**). Es posible que este compuesto actúe como una daumona si los nematodos lo detectan en el medio, ya que al ser este un producto de desecho se puede considerar una señal negativa de manera que el nematodo se transformará a su estadio de resistencia (**San-Blas et al., 2008**).

### **5.3 Propagación “in vitro” de *Steinernema carpocapsae* en medio sólido**

Para mantener la cepa del nematodo se utilizaron placas de agar nutritivo con grasa de cerdo (ANGC) (Anexo I) las que se inocularon con una alícuota de 0.7 mL de un cultivo en medio mineral YS (Anexo I) de *X. nematophila* con 18 horas de incubación. Las placas se incubaron por 24 horas a 30 °C en la oscuridad. Posteriormente cada placa se inoculó con 2,000 IJ de la cepa de *S. carpocapsae* y se incubó en la obscuridad a 25 °C. Después de 10 a 15 días de incubación, la superficie del agar se lavó con agua destilada para arrastrar los nematodos en estadio IJ que se produjeron. La muestra colectada se lavó con agua estéril y centrifugó a 3000 rpm por 2 minutos; posteriormente se sometió a un proceso de sanitización con merthiolate al 0.2 % estéril y se almacenó en 50 mL de agua destilada con 50 µL de tritón X-100 a 4-10 °C (**Suárez, 2002**).

### **5.4 Sincronización y axenización de *Steinernema carpocapsae***

Obtener cultivos sincrónicos de *S. carpocapsae* es fundamental para establecer con precisión las cinéticas de evolución del nematodo. La evolución sincrónica requiere que los huevos obtenidos de las hembras grávidas tengan densidad similar (**Patel y McFadden, 1978**), lo que

garantiza que la eclosión de los nematodos se dé simultáneamente en un porcentaje importante. De un cultivo "in vitro" de *S. carpocapsae* después de 72 horas de incubación en medio ANGC, se aislaron varias hembras grávidas, las que se lavaron en tres ocasiones con 40 ml de agua estéril. Después se les adicionó una solución de hipoclorito alcalino (NaOH 0.4 M + NaClO 0.2 M) para provocar la lisis de las mismas y liberar los huevos en el medio. El contacto entre las hembras y la solución de hipoclorito alcalino no debe de exceder 10 minutos ya que de ser así los huevos podrían sufrir daño químico. Posteriormente la suspensión de nematodos lisados se transfirió a un tubo estéril y se centrifugó a 2300 rpm por 3 minutos. Los huevos obtenidos de la centrifugación de las hembras lisadas, se lavaron en tres ocasiones utilizando dos soluciones reguladoras de fosfatos de diferentes concentraciones,  $\rho = 1.076 \text{ g/cm}^3$  (M1) y  $\rho = 1.157 \text{ g/cm}^3$  (M2) (Suárez, 2002).

### **5.5 Cuenta directa de *Steinernema carpocapsae***

Para realizar los ensayos con compuestos tipo daumona es necesario conocer el número de nematodos presentes en el medio de cultivo, además de conocer el porcentaje de nematodos en el estadio IJ; de manera que debe realizarse una cuenta directa, ésta se realizó en una cámara de McMaster usando un microscopio óptico y el objetivo 10x para la correcta observación de los diferentes estadios del nematodo.

### **5.6 Sistemas axénicos para ensayos con compuestos tipo daumona**

En los sistemas en los que se realizan los ensayos con los compuestos tipo daumona, para no tener interferencias por efecto sinérgico de otros organismos, fue necesario que su simbionte bacteriano no esté vivo, de manera que se probaron tres métodos diferentes para lograr un

sistema axénico; 1) radiación UV, 2) uso de antibióticos y 3) medio complejo MbmHb (medio basal modificado con hemoglobina y colesterol) (Anexo I).

#### **5.6.1. Ensayo con radiación UV para la inactivación de *X. nematophila***

*X. nematophila* se sembró de forma masiva en placas de ANGC, éstas se incubaron a 25°C durante 24 horas. Una vez obtenido el crecimiento de la bacteria en toda la superficie del medio de cultivo, las placas se expusieron a la radiación bajo una lámpara de luz UV de 15W por 5, 10, 15 y 20 minutos y por 4, 8, 12, 16, 20 y 24 horas. Una vez concluida la exposición a la luz UV, se sembró una asada del crecimiento bacteriano de las placas en caldo nutritivo con la finalidad de comprobar la inactivación de la bacteria. Los frascos con caldo nutritivo se incubaron en agitación constante durante 96 horas a 28°C a una velocidad de 200 rpm. Los ensayos se realizaron por triplicado.

#### **5.6.2. Ensayo con antibióticos para la inactivación de *X. nematophila***

Los tratamientos que se llevaron a cabo se muestran en la tabla 3. *X. nematophila* se sembró en placas conteniendo ANGC de forma masiva y se incubó a 28°C durante 24 horas. Una vez que hubo crecimiento, a las placas se les adicionó la mezcla de antibióticos correspondiente para lograr la inactivación de la bacteria. Después de la adición de los antibióticos, las placas se incubaron por 24 horas a 28°C. Posteriormente se sembró una asada del crecimiento bacteriano en caldo nutritivo para comprobar si se inactivó el crecimiento bacteriano. Finalmente los frascos con el caldo nutritivo se incubaron en agitación constante durante 96 horas a 28°C y 200 rpm.

Tabla 3. Tratamientos a base de antibióticos para la inactivación de *X. nematophila*

<b>Tratamiento</b>	<b>Concentración de antibióticos</b>
<b>g-a</b>	Gentamicina 100 µg - Ampicilina 100 µg
<b>G-a</b>	Gentamicina 1000 µg - Ampicilina 100 µg
<b>g-A</b>	Gentamicina 100 µg - Ampicilina 1000 µg
<b>G-A</b>	Gentamicina 1000 µg - Ampicilina 1000 µg
<b>e-a</b>	Estreptomicina 100 µg - Ampicilina 100 µg
<b>E-a</b>	Estreptomicina 1000 µg - Ampicilina 100 µg
<b>e-A</b>	Estreptomicina 100 µg - Ampicilina 1000 µg
<b>E-A</b>	Estreptomicina 1000 µg - Ampicilina 1000 µg
<b>g-e</b>	Gentamicina 100 µg - Estreptomicina 100 µg
<b>G-e</b>	Gentamicina 1000 µg - Estreptomicina 100 µg
<b>g-E</b>	Gentamicina 100 µg - Estreptomicina 1000 µg
<b>G-E</b>	Gentamicina 1000 µg - Estreptomicina 1000 µg

Nota: Cada tratamiento se realizó por triplicado

Inmediatamente después de llevar a cabo los procedimientos para inactivar la bacteria, se inocularon 100 huevos axénicos del nematodo en cada placa de Petri con la finalidad de observar la cantidad de juveniles que eclosionan de los huevos, lo cual se designó como fertilidad de *S. carpocapsae*. Esta se determinó realizando observaciones en el microscopio óptico en objetivo 10x para realizar una cuenta diferencial.

### **5.6.3. Ensayo con medio complejo MBmHb**

En una placa excavada se adicionaron en cada pozo 100 µL de medio basal modificado con hemoglobina y colesterol (MBmHb). Posteriormente se inoculó cada pozo con 100 huevos de *S. carpocapsae* y se incubó en la oscuridad a 28°C durante 10 días. Los pozos se observaron al microscopio diariamente para cuantificar la fertilidad de *S. carpocapsae*.

Todos los métodos descritos con anterioridad se realizaron con el fin de estandarizar la técnica que se usó para realizar los ensayos con los compuestos tipo daumona

### **5.7 Ensayos con compuestos tipo daumona**

Los ensayos realizados con los compuestos tipo daumona (LY294002, *m*-cresol, ácido levulínico y  $\text{NH}_4^{+1}$ ) se realizaron utilizando tres concentraciones (baja, media y alta) y un testigo para cada uno (Tabla 4).

Las pruebas se realizaron en tubos eppendorf de 1.5 mL de capacidad con tapa de rosca en los que se adicionó el medio de cultivo MBmHb, los nematodos en estadio J1 y la cantidad necesaria de cada uno de los compuestos tipo daumona para alcanzar las concentraciones deseadas. Cada tratamiento se realizó por triplicado. Una vez colocados los inóculos de nematodos y compuestos tipo daumona, los tubos se homogeneizaron y se incubaron a 22 °C durante 5 días. Diariamente se realizó una cuenta diferencial por triplicado con ayuda de un microscopio óptico para observar la evolución de los nematodos y la inducción al estadio IJ.



Tabla 4. Tratamientos con los compuestos tipo daumona (LY294002, m-cresol, ácido levulínico y  $\text{NH}_4^{+1}$ ) para observar su efecto en la inducción de estadio IJ del nematodo *S. carpocapsae*

Ensayo	MBmHb	J1 de <i>S. carpocapsae</i>	Compuesto ( 0.5 $\mu\text{L}$ )
Testigo 1	49.5 $\mu\text{L}$	100	Etanol
1	49.5 $\mu\text{L}$	100	m-cresol 50 $\mu\text{M}$
2	49.5 $\mu\text{L}$	100	m-cresol 5 $\mu\text{M}$
3	49.5 $\mu\text{L}$	100	m-cresol 0.5 $\mu\text{M}$
Testigo 2	49.5 $\mu\text{L}$	100	$\text{H}_2\text{O}$ destilada
4	49.5 $\mu\text{L}$	100	Ácido levulínico 50 $\mu\text{M}$
5	49.5 $\mu\text{L}$	100	Ácido levulínico 5 $\mu\text{M}$
6	49.5 $\mu\text{L}$	100	Ácido levulínico 0.5 $\mu\text{M}$
Testigo 3	49.5 $\mu\text{L}$	100	$\text{H}_2\text{O}$ destilada
7	49.5 $\mu\text{L}$	100	$\text{NH}_4\text{OH}$ 1138988 $\mu\text{M}$
8	49.5 $\mu\text{L}$	100	$\text{NH}_4\text{OH}$ 888888 $\mu\text{M}$
9	49.5 $\mu\text{L}$	100	$\text{NH}_4\text{OH}$ 638888 $\mu\text{M}$
Testigo 4	49.5 $\mu\text{L}$	100	Etanol
10	49.5 $\mu\text{L}$	100	LY294002 145.43 $\mu\text{M}$
11	49.5 $\mu\text{L}$	100	LY294002 14.54 $\mu\text{M}$
12	49.5 $\mu\text{L}$	100	LY294002 1.45 $\mu\text{M}$

Nota: Cada tratamiento se realizó por triplicado

### 5.8 Inducción al estadio IJ del nematodo *S. carpocapsae* en un cultivo sumergido

Se realizaron pruebas en un cultivo sumergido llevando a cabo la siguiente metodología: un reactor air-lift con 600 mL de medio YS adicionado con colesterol [0.0125 g/mL], se inoculó con 5% del volumen del reactor de un cultivo de la bacteria *X. nematophila* en fase log y se incubó a 25°C durante 24 horas con un flujo de aire de 0.5 vvm. Transcurridas las 24 horas, se agregaron 500 IJ/mL de *S. carpocapsae*; la incubación continuó en las mismas condiciones durante 20 días. Cada 24 horas se tomó una alícuota de 5 mL del mosto de fermentación del reactor, se eliminaron los nematodos mediante filtración, y el medio de cultivo resultante se adicionó a un frasco de cultivo.

En este frasco se inocularon inmediatamente 2000 J1/mL de *S. carpocapsae*. Los frascos de cultivo se incubaron durante 10 días a 25 °C en agitación constante a una velocidad de 100 rpm. Diariamente se realizó cuenta diferencial con ayuda de un microscopio óptico para observar el porcentaje inducido de IJ. Por otra parte, también se tomaron lecturas de la concentración de amonio y el pH del medio de cultivo del reactor.

## VI. RESULTADOS

### 6.1 Cepa de la bacteria *Xenorhabdus nematophila*

En el aislamiento que se realizó de muestras de hemolinfa de larvas de *Galleria mellonella* infectadas con el estadio IJ de *S. carpocapsae* (Figura 8), se identificó a *X. nematophila* identificada por la morfología microscópica característica realizando tinción de Gram (Figura 9A), así como morfología colonial típica en placas de NBTA (Figura 9B, Tabla 5), la que promovió el desarrollo, crecimiento y reproducción de *S. carpocapsae*.



Figura 8. Trampa de White con larvas de *G. mellonella* infectadas con IJ de *S. carpocapsae*

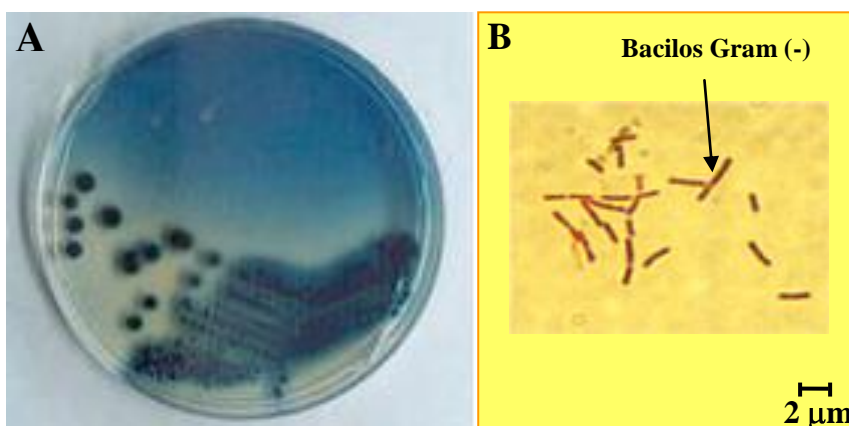


Figura 9. A) Morfología colonial de la bacteria *X. nematophila* aislada en medio NBTA. B) Morfología microscópica de *X. nematophila* teñida con la técnica de Gram.

Tabla 5. Morfología colonial de la bacteria *X. nematophila* aislado en medio NBTa

<b>Color</b>	Azul
<b>Forma</b>	Redonda
<b>Tamaño (mm)</b>	1.5-2.0 (después de 48 horas)
<b>Bordes</b>	Ligeramente irregulares con halo claro en la periferia
<b>Luz reflejada</b>	Brillante
<b>Luz transmitida</b>	Opaca
<b>Aspecto</b>	Liso-húmedo
<b>Consistencia</b>	Butirosa
<b>Elevación</b>	Convexa

## 6. 2 Sincronización y axenización de *Steinernema carpocapsae*

Los huevos de *S. carpocapsae* obtenidos por el proceso de hidrólisis alcalina de hembras grávidas adultas de primera generación (Figura 10) se lavaron con solución de fosfatos para obtenerlos con densidad similar y lograr un desarrollo sincrónico (Figura 11). El porcentaje de eclosión de juveniles J2 cuando se realizaron uno, dos y tres lavados se muestra en la figura 12. **A)** La gráfica muestra la velocidad de aparición de juveniles J2 con respecto al tiempo, cuando se utilizó una solución reguladora de fosfatos para el lavado (densidad  $\rho = 1.076 \text{ g/cm}^3$ ) (M1). Se observó que cuando los huevos se someten a uno, dos y tres lavados, se obtiene un porcentaje aproximado de eclosión de 60%, 80% y 85%, respectivamente después de 48 horas de incubación. **B)** La gráfica muestra la velocidad de aparición de juveniles J2 con respecto al tiempo de incubación, cuando se utilizó una solución reguladora de fosfatos con densidad  $\rho = 1.157 \text{ g/cm}^3$  (M2), en esta se observó que cuando los huevos se someten a uno, dos y tres lavados, se obtiene un porcentaje aproximado de eclosión de J2 de 70%, 90% y 98%, respectivamente después de 48 horas de incubación.



Figura 10. Hembra grávida de primera generación de *Steinernema carpocapsae*, obtenida de un cultivo “in vitro” de nematodos en ANGK después de 72 horas de incubación. La parte oscura muestra el útero lleno de huevos.

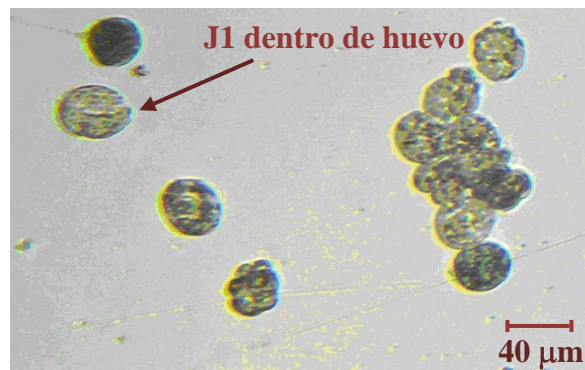


Figura 11. Huevos axénicos de *Steinernema carpocapsae* suspendidos en solución de fosfatos M2.

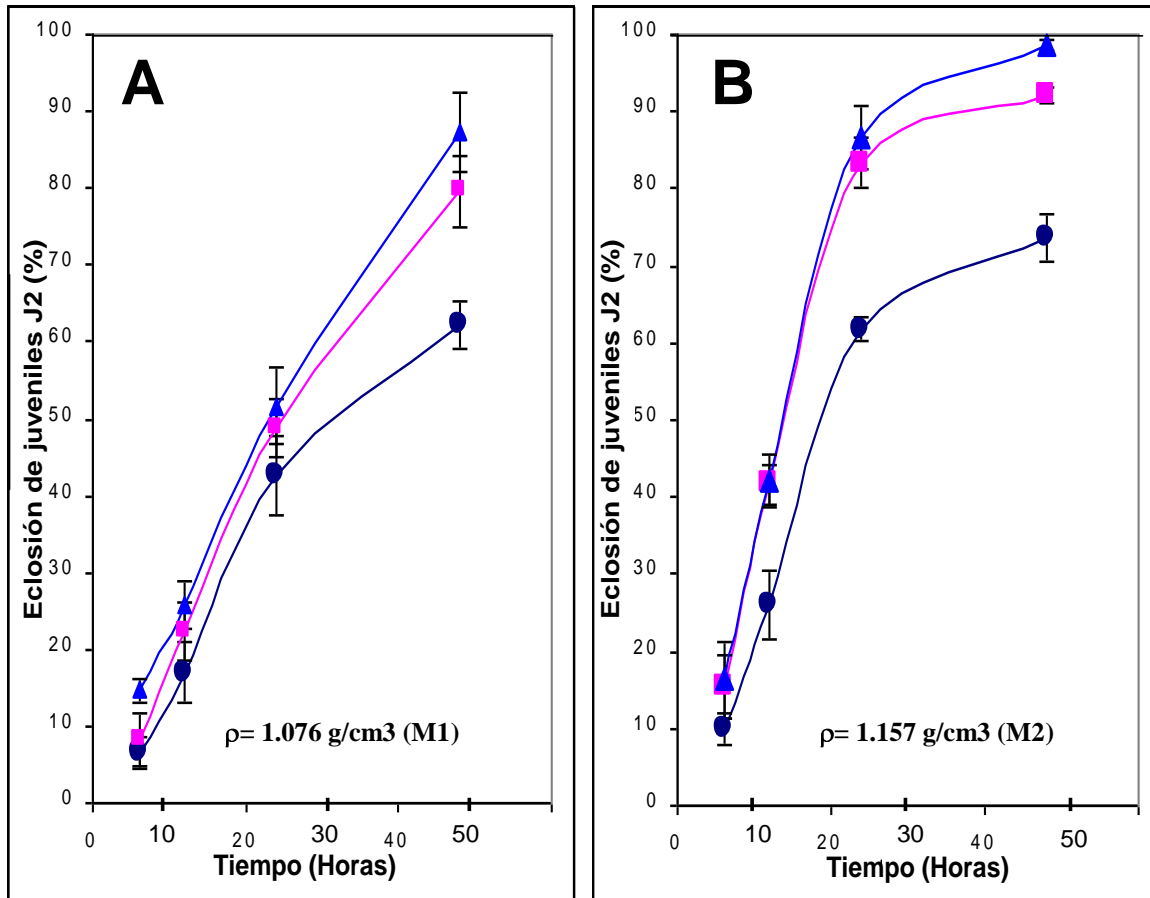


Figura 12. Obtención de juveniles J2 de *Steinernema carpocapsae*. Los huevos aislados de hembras grávidas fueron sometidos a ● uno, ■ dos y ▲ tres lavados con solución reguladora de fosfatos después de su aislamiento por un proceso de lisis alcalina.

### 6.3 Sistemas axénicos para ensayos con compuestos tipo daumona

#### 6.3.1 Ensayo con radiación UV para la inactivación de *X. nematophila*

Cuando el método para la obtención de sistemas axénicos fue la radiación de las células de *X. nematophila* con luz UV, se observó que efectivamente las células habían sido inactivadas ya que el caldo nutritivo que se inoculó con la muestra de bacterias irradiadas, no presentó crecimiento, pero se observó que estos sistemas experimentales fueron incapaces de promover la eclosión de los juveniles de *S. carpocapsae* de los huevos inoculados en las placas (Tabla 6).

Tabla 6. Tratamientos con radiación UV para la inactivación de *X. nematophila* para ensayos con compuestos tipo daumona

<b>Tiempo de exposición</b>	<b>Sobrevivencia de <i>X. nematophila</i></b>	<b>Fertilidad de <i>S. carpocapsae</i></b>
5 min.	Negativo	Negativo
10 min.	Negativo	Negativo
15 min.	Negativo	Negativo
20 min.	Negativo	Negativo
4 horas	Negativo	Negativo
8 horas	Negativo	Negativo
12 horas	Negativo	Negativo
16 horas	Negativo	Negativo
20 horas	Negativo	Negativo
24 horas	Negativo	Negativo

Nota: Los ensayos se realizaron por triplicado

### **6.3.2 Ensayo con antibióticos para la inactivación de *X. nematophila***

La Figura 13 muestra los resultados obtenidos en el ensayo para la inactivación de *X. nematophila* con las mezclas de los antibióticos ampicilina, estreptomycin y gentamicina. Este segundo procedimiento fue efectivo también para inactivar las células de la bacteria y no inhibió del todo la eclosión de los juveniles, aunque como se aprecia en la gráfica, el porcentaje de fertilidad fue de aproximadamente 35 % en el mejor de los casos. En este caso, aunque algunos juveniles lograron eclosionar, no pudieron desarrollarse hasta adultos reproductivos y algunos de ellos, apenas eclosionaron, tras un breve lapso se lisaron (Figura 14).

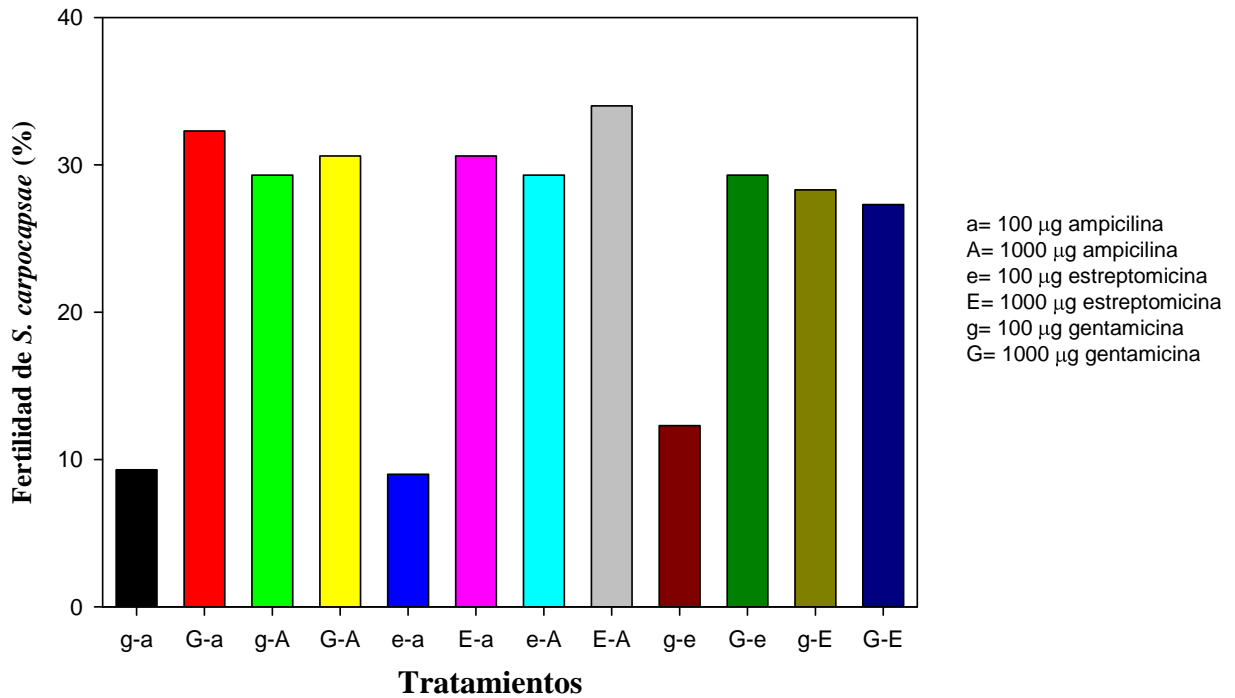


Figura 13. Inactivación de *X. nematophila* con las mezclas de los antibióticos ampicilina, estreptomicina y gentamicina. Se observó que con mezclas de antibióticos en la concentración baja (g-a, e-a, y g-e) se obtuvo un porcentaje de fertilidad de nematodos de  $10 \pm 2\%$  aproximadamente. Sin embargo, en el resto de los tratamientos se obtuvieron porcentajes de fertilidad de  $31 \pm 3\%$  en promedio. Los resultados que se observan en la gráfica son el promedio de tres repeticiones para cada tratamiento.

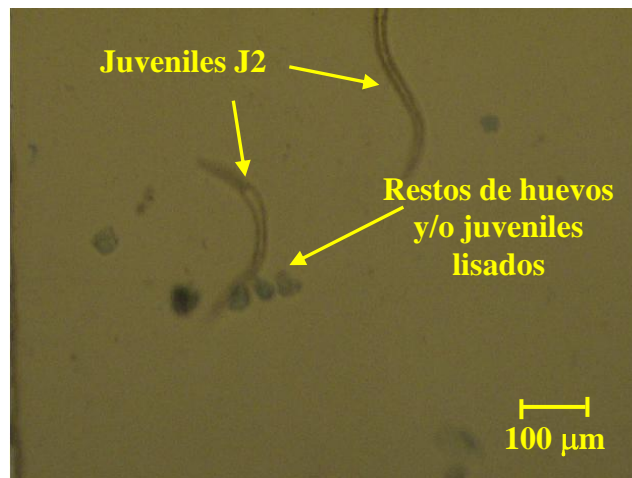


Figura 14. Fotografía de los resultados obtenidos en el ensayo para la inactivación de *X. nematophila* con las mezclas de los antibióticos ampicilina, estreptomicina y gentamicina. Se observaron algunos juveniles J2 de *S. carpocapsae* que eclosionaron y restos de los huevos que se lisaron.



### 6.3.3 Ensayo con medio complejo MBmHb para los ensayos con compuestos tipo daumona

El tercer sistema en el que se ensayó el cultivo axénico de *S. carpocapsae* a partir de huevos, tuvo los mejores resultados pues promovió la eclosión de los juveniles y soportó el desarrollo y reproducción del nematodo. En la figura 15 se aprecia que la fertilidad del nematodo en este ensayo alcanzó un  $79 \pm 9 \%$ .

En el medio MBmHb se logró el establecimiento “in vitro” del ciclo de vida completo de *S. carpocapsae* (Figura 16).

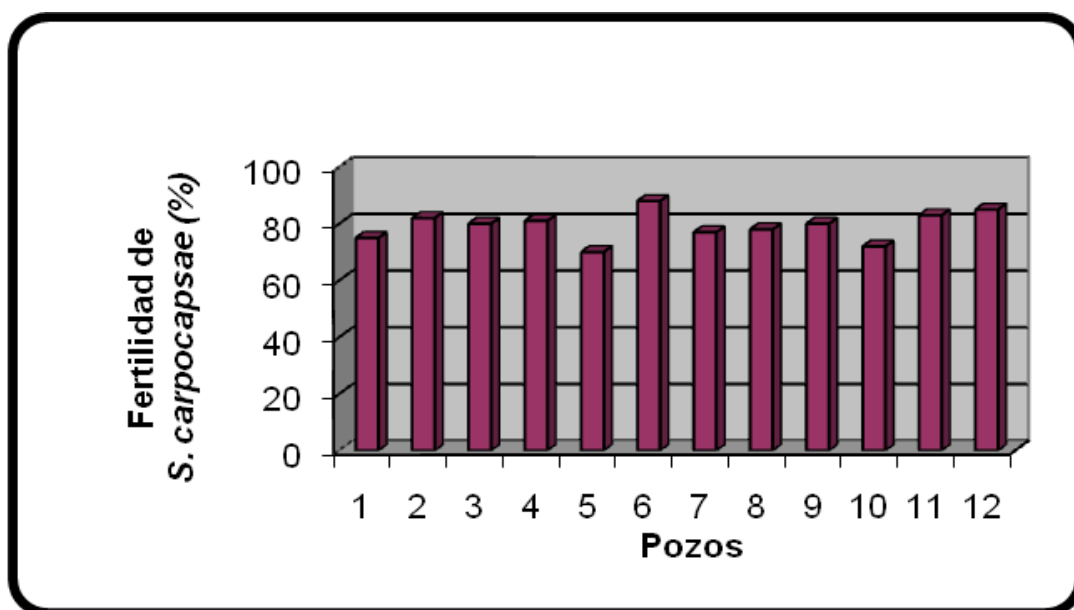


Figura 15. Resultados del ensayo con medio MBmHb (medio basal modificado con hemoglobina más colesterol). Se observa que se obtuvo una fertilidad del  $79 \pm 9 \%$  de *S. carpocapsae*. Los resultados son el promedio de tres repeticiones.

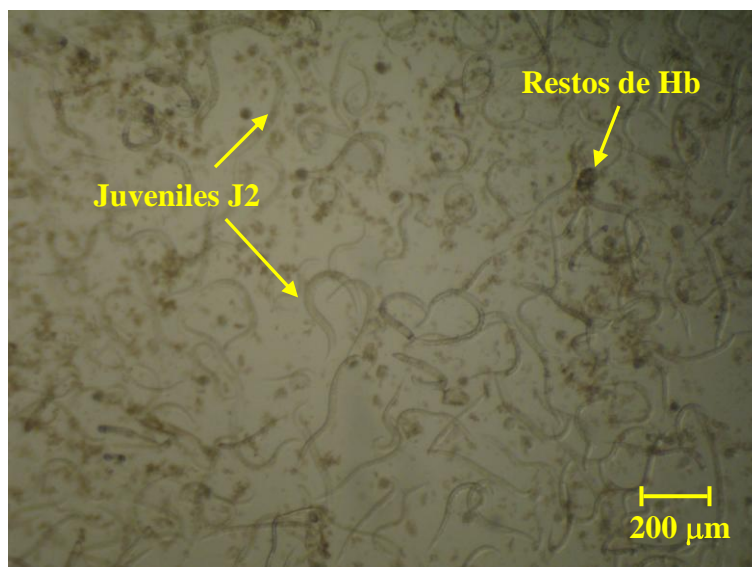


Figura 16. Fotografía de los resultados del ensayo con medio MBmHb (medio basal modificado con hemoglobina mas colesterol). Se observa que una gran cantidad ( $79 \pm 9 \%$ ) de juveniles J2 eclosionaron de los huevos que se inocularon en el medio de cultivo. Además se observan algunos restos de la hemoglobina (Hb) que se adicionó y que se aglutina en el medio.

Los ensayos anteriores sirvieron para seleccionar el sistema experimental axénico ideal el cual resultó ser con el medio MBmHb. Por lo tanto este fue el sistema que se utilizó para evaluar los compuestos tipo daumona.

## 6.4 Ensayos con compuestos tipo daumona

### 6.4.1 Ensayo con *m*-cresol

Los compuestos usados para frenar el desarrollo e inducir el estadio de resistencia en los nematodos no mostraron el efecto deseado. El *m*-cresol a diferentes concentraciones a las cuales se expusieron los juveniles J1 afectó el desarrollo del nematodo ya que en ningún caso se observó sobrevivencia del mismo (Tabla 7). En todos los ensayos con este compuesto se observaron los nematodos muertos ya que se encontraron inmóviles y completamente

extendidos (Figura 17), a diferencia del testigo en el que los nematodos se observaron vivos y móviles y se desarrollaron hasta adultos reproductivos.

Tabla 7. Porcentaje de formación de infectivos juveniles del nematodo *S. carpocapsae* utilizando m-cresol a tres concentraciones y realizando las lecturas cada 24 horas durante 5 días.

Edad (días)	Testigo		m-cresol					
	Otros	% IJ	Conc. Otros	baja % IJ	Conc. Otros	media % IJ	Conc. Otros	alta % IJ
1	81	0	90 (M)	0	97 (M)	0	91 (M)	0
2	86	0	M	0	M	0	M	0
3	92	0	M	0	M	0	M	0
4	84	0	M	0	M	0	M	0
5	95	0	M	0	M	0	M	0

Nota: los resultados son el promedio de tres repeticiones. M= muertos

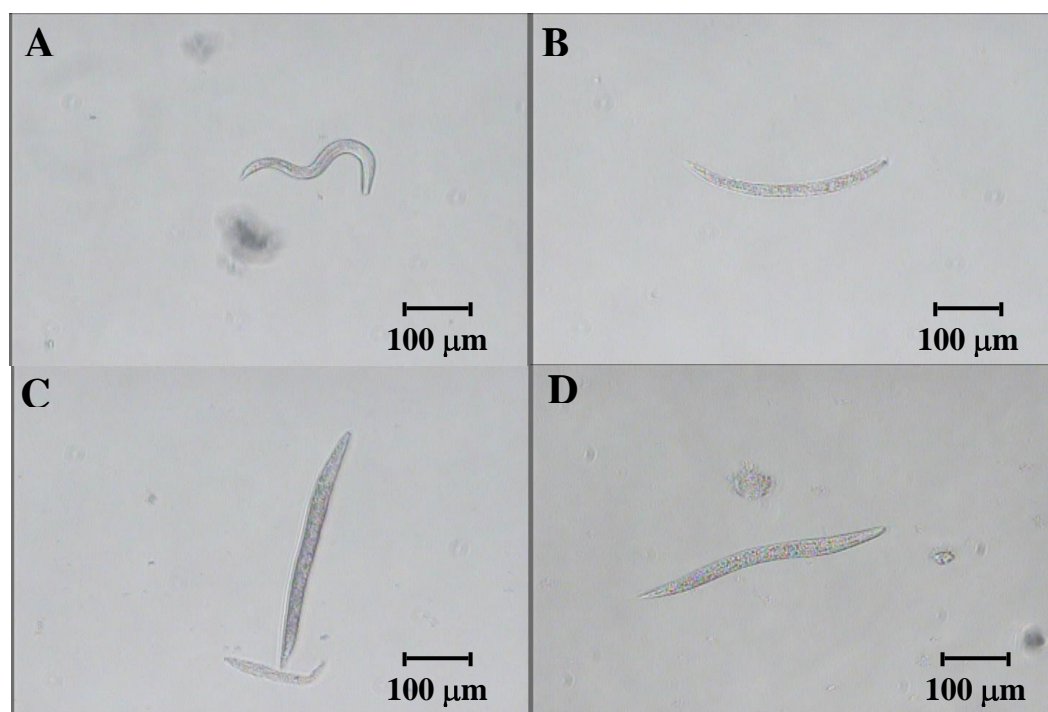


Figura 17. Fotografías de algunos especímenes del bioensayo con m-cresol. A) Testigo. B) Concentración baja. C) Concentración media. D) Concentración alta. Las fotografías fueron tomadas después de 24 horas de incubación.

### 6.4.2 Ensayo con Ácido levulínico

El uso del ácido levulínico no fue inhibitorio (Tabla 8), ya que éste compuesto parece tener un efecto positivo en el desarrollo del nematodo pues aparentemente los juveniles que se sometieron a la concentración más alta se observaron con un mayor tamaño con respecto al testigo (Figura 18).

Tabla 8. Porcentaje de formación de IJ del nematodo *S. carpocapsae* utilizando ácido levulínico a tres concentraciones y realizando las lecturas cada 24 horas durante 5 días.

Edad (días)	Testigo		Ácido levulínico					
	Otros	% IJ	Conc. baja Otros	% IJ	Conc. media Otros	% IJ	Conc. alta Otros	% IJ
1	71	0	66	0	69	0	86	0
2	73	0	67	0	63	0	71	0
3	67	0	59	0	62	0	69	0
4	79	0	53	0	69	0	87	0
5	79	0	57	0	66	0	80	0

Nota: los resultados son el promedio de tres repeticiones.

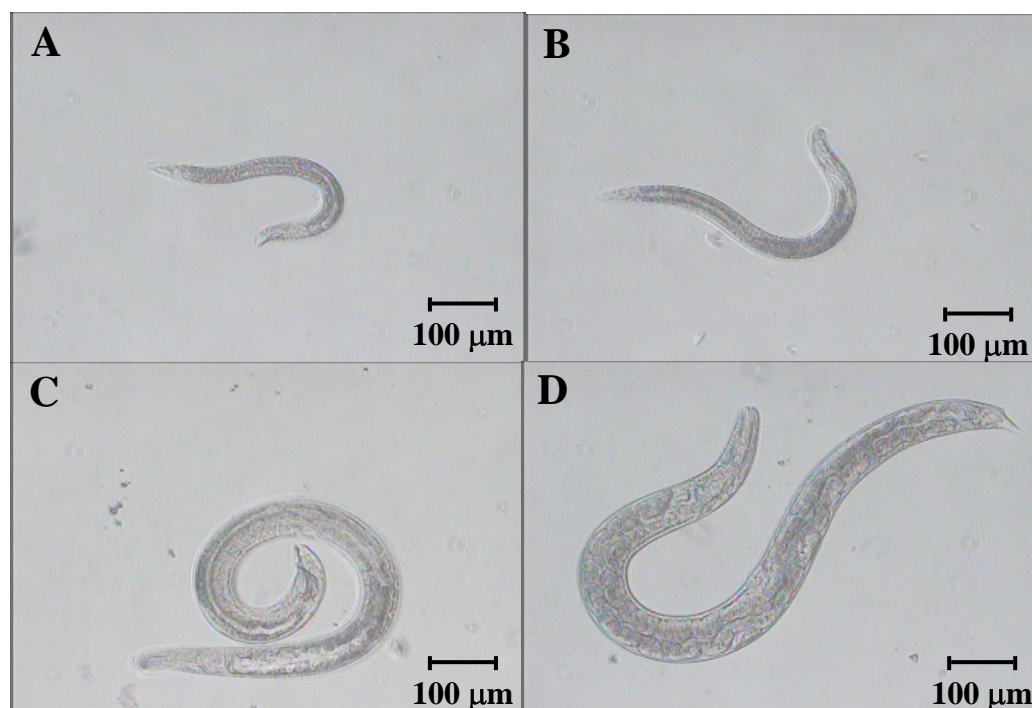


Figura 18. Fotografías de algunos especímenes con ácido levulínico. A) Testigo. B) Concentración baja. C) Concentración media. D) Concentración alta. Las fotografías fueron tomadas después de 72 horas de incubación.

### 6.4.3 Ensayo con LY294002

Cuando se uso el compuesto LY294002 (Tabla 9) se observó un menor desarrollo en las concentraciones alta y media del compuesto con respecto al testigo ya que a las 120 h de incubación el testigo mostró nematodos en estadio adulto y en las concentraciones media y alta del compuesto los nematodos se observaron vivos y activos pero en estadio J2 (Figura19).

Tabla 9. Porcentaje de formación de IJ del nematodo *S. carpocapsae* utilizando LY294002 a tres concentraciones y realizando las lecturas cada 24 horas durante 5 días.

Edad (días)	Testigo		LY294002					
	Otros	% IJ	Conc. Otros	baja % IJ	Conc. Otros	media % IJ	Conc. Otros	alta % IJ
1	86	0	114	0	73	0	43	0
2	119	0	106	0	111	0	91	0
3	115	0	102	0	108	0	61	0
4	116	0	99	0	101	0	45	0
5	105	0	90	0	94	0	31	0

Nota: los resultados son el promedio de tres repeticiones.

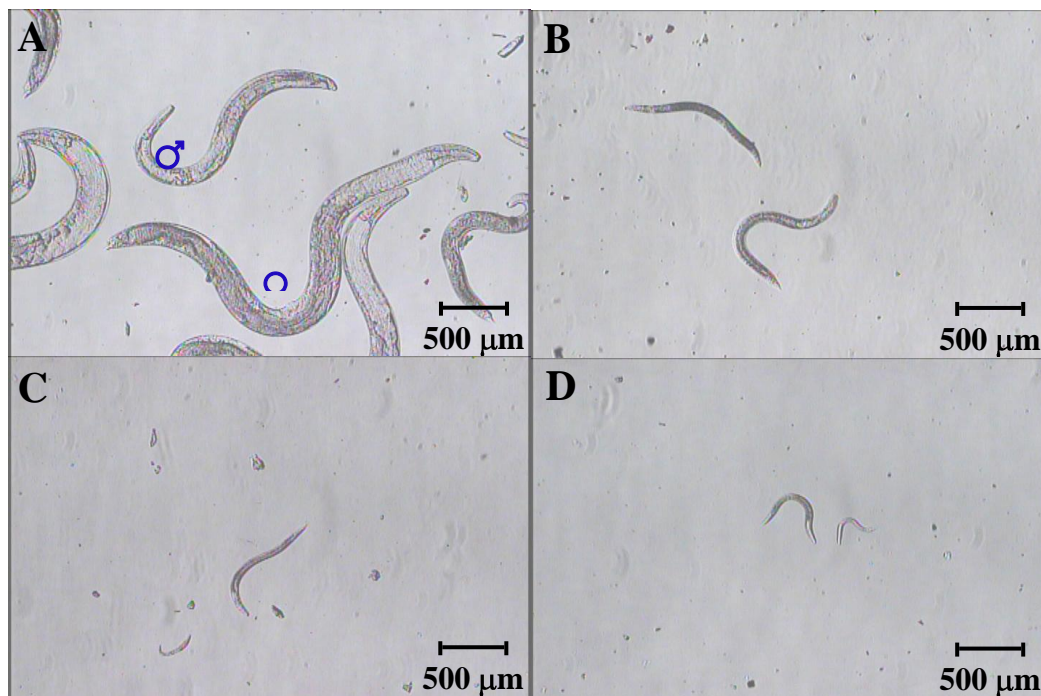


Figura 19. Fotografías de algunos especímenes del bioensayo con LY294002. A) Testigo. B) Concentración baja. C) Concentración media. D) Concentración alta. Las fotografías se tomaron después de 120 horas de incubación.

#### 6.4.4 Ensayo con $\text{NH}_4^{+1}$

Con estos compuestos, al igual que en los tres anteriores, tampoco se logró la inducción del estadio IJ (Tabla 10). Se observaron los nematodos muertos en la concentración más alta, ya que se encontraron completamente extendidos e inmóviles desde las primeras 24 horas de incubación. Las otras dos concentraciones no presentaron diferencias aparentes con respecto al testigo (Figura 20).

Tabla 10. Porcentaje de IJ del nematodo *S. carpocapsae* utilizando amonio ( $\text{NH}_4^{+1}$ ) a tres concentraciones y realizando las lecturas cada 24 horas durante 5 días.

Edad (días)	Testigo		Amonio					
	Otros	% IJ	Conc. baja	Conc. media	Conc. alta	Otros	% IJ	Otros
1	71	0	83	0	80	0	67(M)	0
2	80	0	78	0	67	0	M	0
3	82	0	82	0	74	0	M	0
4	83	0	82	0	79	0	M	0
5	78	0	79	0	76	0	M	0

Nota: los resultados son el promedio de tres repeticiones. M= Muertos.

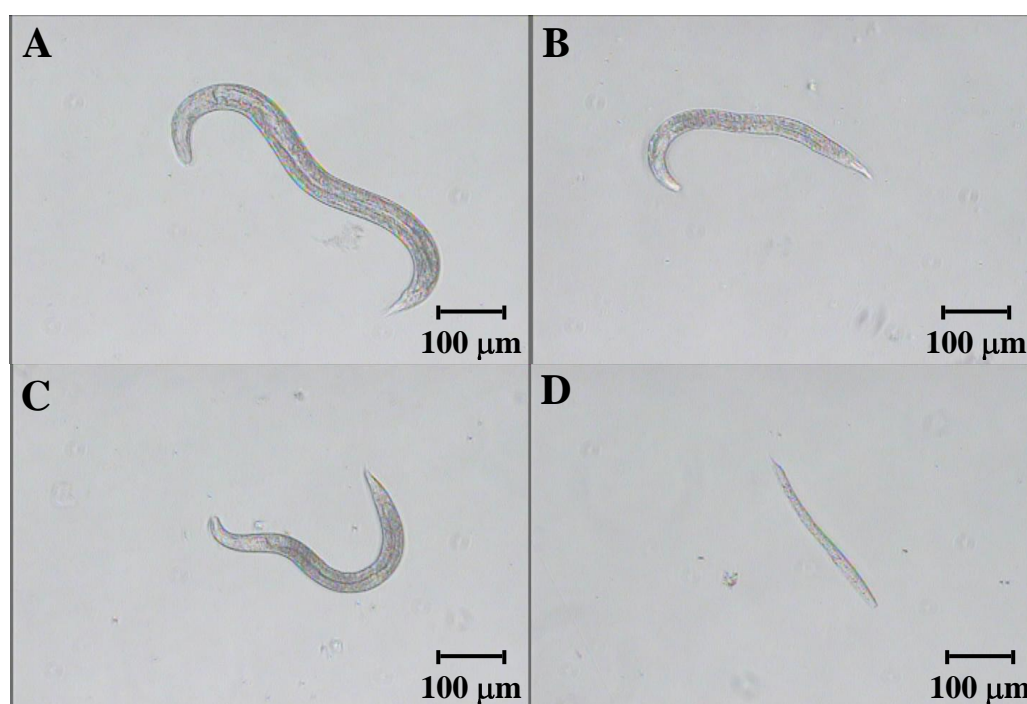


Figura 20. Fotografías de algunos especímenes del bioensayo con amonio ( $\text{NH}_4^{+1}$ ). A) Testigo. B) Concentración baja. C) Concentración media. D) Concentración alta. Las fotografías se tomaron después de 120 horas de incubación.

## 6.5 Pruebas de inducción al estadio IJ del nematodo *S. carpocapsae* utilizados en cultivo sumergido

El uso de un medio de cultivo conteniendo metabolitos producidos por el propio nematodo fue otro método con el que se intentó la inducción del estadio IJ. Con este procedimiento, aún cuando fue cualitativo pues el mosto de fermentación que se usó como sustrato para inocular los nematodos no se caracterizó para identificar las moléculas con el efecto de daumona; con este proceso se logró la inducción en un alto porcentaje de IJ (Tabla 11, Figura 21), ya que después de 8 días de incubación, se observó un  $74 \pm 7\%$  de IJ de *S. carpocapsae*. Estos se identificaron por su característica doble cutícula (Figura 22). La figura 23 muestra los resultados de las mediciones de  $\text{NH}_4^{+1}$  y pH que se realizaron en el medio de cultivo del reactor air-lift.

Tabla 11. Porcentaje de formación de infectivos juveniles del nematodo *S. carpocapsae* utilizados en cultivo sumergido

Edad (Días)	Otros estadios	%IJ
1	25	67
2	14	79
3	37	74
4	22	79
5	35	81
6	34	71
7	43	74
8	11	88

Nota: los resultados son el promedio de tres repeticiones.

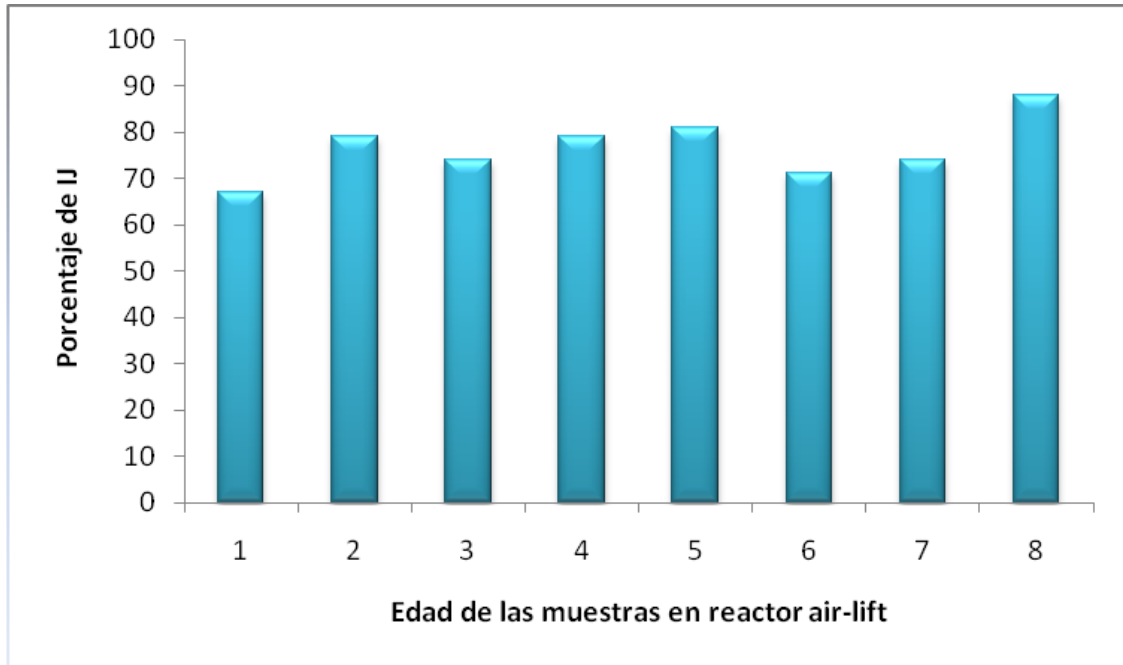


Figura 21. Porcentaje de infectivos juveniles del nematodo *S. carpocapsae* en cultivo sumergido. Se observa que después de haber incubado durante ocho días el medio de cultivo, el  $74 \pm 7\%$  de los nematodos que se inocularon en estadio J1 se transformaron al estadio IJ.

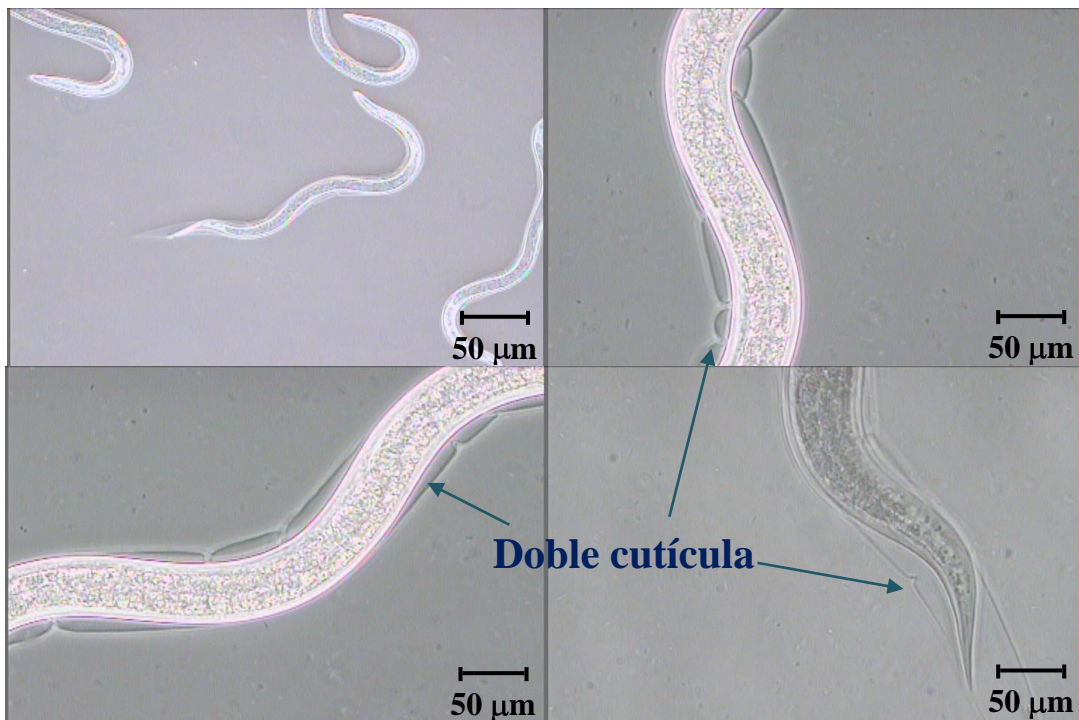


Figura 22. Fotografía de algunos especímenes del bioensayo en cultivo sumergido. Se observa una doble cutícula característica de los IJ que se formaron después de 8 días de incubación en el medio de cultivo.



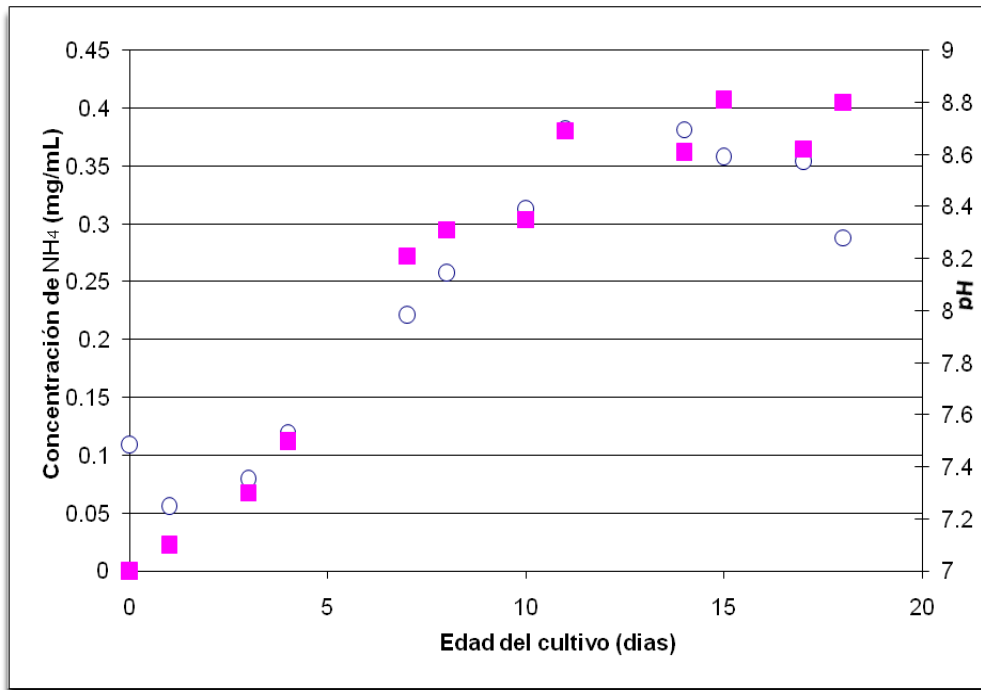


Figura 23. Mediciones de pH ■ y amonio ○ en el medio de cultivo del reactor air-lift usado en el bioensayo de inducción al estadio IJ de *S. carpocapsae* en cultivo sumergido.

## VII. DISCUSIÓN

Las pruebas realizadas con los compuestos tipo daumona (*m*-cresol, ácido levulínico, LY294002 y amonio) mostraron para el *m*-cresol todos los nematodos aparecieron muertos a las 24 horas en las tres concentraciones probadas (Tabla7, Figura 17). Este compuesto se propuso como posible inductor del estadio IJ debido a que es un compuestos que pertenece al grupo de los fenoles y éstos se usan en desinfectantes, fungicidas y plaguicidas, de manera que este sería una de las señales negativas que detectaría el nematodo en su medio ambiente y probablemente desviaría su desarrollo a la fase de resistencia (IJ). Se sabe que el *m*-cresol daña la membrana celular, desnaturaliza proteínas, desacopla la fosforilación oxidativa, y evita la incorporación del fosfato inorgánico al ATP sin afectar el transporte de electrones (**Alpuche, 1990**). Además, el cresol se encuentra frecuentemente en el suelo de manera natural como producto de la degradación microbiana, como metabolito en la orina de los mamíferos o como constituyente lipídico de algunas especies de plantas (**INE-SEMARNAP, 2000**), de manera que si este compuesto ha sido usado previamente para eliminar alguna plaga puede haber residuos de este en el suelo de manera que no sería posible usar nematodos entomopatógenos para controlar plagas posteriores porque existirán residuos del compuesto que resultan tóxicos para los nematodos. Por otro lado, algunos compuestos químicos tienen un efecto activador de los estadios IJ de *S. carpocapsae*. Por ejemplo, una solución diluida de oxamyl (insecticida/nematicida), el jugo de la col y plantas de aloe pueden estimular la actividad de estos organismos. Aunque los nematodos activados químicamente no siempre muestran movimientos normales. Los movimientos son de muchos tipos dependiendo de las propiedades de los compuestos químicos usados para su activación, pueden mostrar grandes

ondulaciones sinusoidales, así como torceduras, espasmos o convulsiones, y otros movimientos descoordinados (**Gaugler y Kaya, 1990**).

El ensayo con el ácido levulínico presentó un resultado interesante, ya que los nematodos sometidos a la concentración más alta del compuesto, aumentaron su desarrollo ya que estos, comparados con el testigo (Figura 18A) se encontraban en un estadio mayor de desarrollo en el mismo tiempo de incubación. Se observa en la Figura 18B que corresponde a la concentración baja, un estadio de desarrollo similar al testigo en cambio en las concentraciones media y alta (Figuras 18C-D, respectivamente) los nematodos se observaron ya con algunas estructuras propias del estadio adulto. El ácido levulínico es el cetoácido más sencillo y se obtiene como metabolito secundario a partir de hexosas como la fructosa (levulosa), cuando se procesa la caña de azúcar. Este compuesto se usa en la manufactura del nylon y algunos farmacéuticos (**Beyer y Walter, 1987**). Desafortunadamente no se conoce el mecanismo de acción que tiene este compuesto sobre alguna ruta metabólica de los organismos eucariontes.

La prueba con LY294002 mostró que a medida que se aumenta la concentración del compuesto, los nematodos disminuyen su tamaño debido a que se quedan en estadio J2 a diferencia del testigo en el que en el mismo tiempo de incubación se observaron adultos completamente formados e incluso se logró la fecundación, ya que las hembras se observan con el útero lleno de huevos (Figura 19A). El LY294002 es un inhibidor de la enzima fosfatidil inositol 3-OH cinasa, en general el fosfatidil inositol es un componente de la membrana plasmática de todas las células eucarióticas, actúa como depósito de moléculas mensajeras que se liberan en el interior de la célula cuando ciertas señales extracelulares interactúan con receptores específicos de la membrana plasmática (**Nelson y Cox, 1998**). El

fosfatidil inositol tiene muchas funciones en las células de organismos eucariontes, como el crecimiento celular, proliferación, movilidad, supervivencia celular, tráfico intracelular y es un componente importante en la cascada de señalización de la insulina, interactuando como sustrato del receptor de insulina con el fin de regular la entrada de glucosa a la célula por medio de una serie de eventos de fosforilación (**Ling-Sheu et al., 2004**) de manera que si la enzima que se encarga de una de estas fosforilaciones se encuentra inhibida, esto podría estar causando una disminución del desarrollo del nematodo. Cabe agregar que en *C. elegans*, un receptor de insulina regula el desarrollo de adultos y la formación del estadio dauer (**Ailion, 1999**). Más de 30 genes (*daf*) están involucrados en el control de la formación de estadios dauer (**Riddle y Albert, 1997**).

En el ensayo con amonio, se observó que la concentración más alta resultó ser tóxica para los nematodos ya que aparecieron muertos desde la primera observación a las 24 horas, los que fueron expuestos a la concentración media y baja presentaron un desarrollo muy similar al testigo. En ningún caso se logró inducir el estadio IJ (Tabla 10). Sin embargo otros investigadores como **San-Blas et al.** (2008) quienes llevaron a cabo la inducción al estadio de resistencia (IJ) de *S. feltiae* usando un método de producción “in vivo”, utilizando concentraciones de amonio de 2.5 mg/g de larva, fueron suficientes para promover la inducción de los IJ y su eclosión de larvas de insecto infectadas del nematodo *S. feltiae*. En el presente trabajo, se probaron concentraciones de amonio similares al trabajo de **San-Blas et al.**, pero no se logró la inducción; cabe resaltar el hecho de que un sistema “in vivo” y uno “in vitro” son muy diferentes. En el primero existen diversos factores tales como la tensión de oxígeno, pH, alta densidad poblacional, la presencia del simbionte bacteriano, los compuestos que produce la bacteria como antibióticos y toxinas, entre otros, los que pueden tener un

efecto sinérgico con la concentración de amonio y pueden resultar determinantes para lograr la inducción del estadio IJ. Mientras que en un sistema “in vitro” la tensión de oxígeno y el pH son diferentes, la cantidad de nematodos es menor, no se encuentra presente el simbionte bacteriano por tratarse de un sistema axénico, de manera que ninguno de los metabolitos producidos por la bacteria se encuentran presentes y por esta razón no se logran los mismos resultados en ambos métodos.

### **Inducción de infectivos juveniles en un cultivo sumergido**

Cuando se evaluó la inducción de IJ en un medio sumergido se utilizó como sustrato el medio YS el cual tiene una composición mínima con solo algunas sales y extracto de levadura. A este medio se adicionó colesterol, compuesto indispensable para el desarrollo del nematodo (**Kurzchalia y Ward, 2003**). La razón de usar este medio de cultivo fue tener una aproximación a las condiciones que se usaron en los trabajos de **Golden y Riddle (1982)** y **Pan-Young et al. (2005)**; quienes aislaron la daumona del nematodo *C. elegans* a partir de cultivos agotados, es decir, medio de cultivo en el que se había desarrollado este organismo con anterioridad de manera que cualquier compuesto producido por los estadios dauer, estaría presente en el medio de cultivo; haciendo posible por ello el aislamiento y purificación de estos compuestos. Según estos autores, las condiciones en que se produce la daumona es cuando existe una baja cantidad de nutrientes en el medio de cultivo. De manera que la baja cantidad de alimento, la presencia de compuestos responsables de la inducción y la alta densidad poblacional en los frascos de cultivo que se usaron en la presente investigación indujeron la transformación de los nematodos al estadio IJ en un corto tiempo en comparación

con los 20 días en promedio que se requieren para que esto ocurra en un medio de cultivo rico en nutrientes (**Chavarria et al., 2006**).

Es importante señalar como se muestra en la figura 21, la concentración de amonio en el medio de cultivo sumergido en el reactor air-lift fue diez veces menor que la empleada en el experimento de **San-Blas et al.** (2008). Como se mencionó antes, en la prueba de inducción con amonio no se lograron buenos resultados por usar un método axénico. En contraste, con este método se logró la inducción del estadio IJ, debido a la presencia del simbiote bacteriano y a otros factores presentes en un experimento “in vivo”.

En los ensayos en los que se usó medio de cultivo del reactor air-lift para inducir la transformación a IJ se observó un alto porcentaje de inducción lo que parece indicar que en el medio de cultivo en el que crece previamente *S. carpocapsae*, hay señales químicas que indican a los estadios juveniles que éste ya no es un ambiente óptimo para la reproducción por lo que se dirigen sus esfuerzos metabólicos a la transformación al estadio de resistencia (IJ).

Como se mencionó antes, se desarrollaron técnicas con el fin de estandarizar los métodos que se usaron en las pruebas con compuestos tipo daumona, en seguida se discuten los resultados obtenidos en tales experimentos.

La cepa de *Xenorhabdus nematophila* que se aisló de las larvas de *Galleria mellonella* (Figura8) infectadas con IJ de *Steinernema carpocapsae*, se obtuvo en fase primaria. Esta fase es óptima para lograr la infección y muerte de los insectos. La fase primaria se caracteriza por presentar colonias azules en el medio de cultivo NBTA (Figura 9A), este medio contiene azul de bromotimol (BTB) y cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) de manera que la bacteria en esta fase absorbe el colorante y reduce la sal, lo que no sucede con la fase secundaria, pues esta última solo tiene la capacidad de reducir el TTC pero no absorbe el BTB, de manera que

cuando se cultiva en NBTA produce colonias rojas (**Akhurst, 1980**). Las observaciones que se realizaron de preparaciones frescas y por tinción de Gram, permitieron determinar que las células de esta bacteria tienen en general forma de bacilos cortos en la fase primaria siendo Gram negativos y móviles (Figura 9B). Esto concuerda con las observaciones realizadas en otros trabajos de investigación (**Woodring y Kaya, 1988; Akhurst y Boemare, 1990**).

La obtención de huevos axénicos (sin la bacteria simbiote *X. nematophila*) de *S. carpocapsae* se logró con el procedimiento de lisis con hipoclorito alcalino a partir de hembras grávidas de primera generación, este procedimiento puede en ocasiones resultar bastante agresivo (**Lunau et al., 1993; Ehlers y Strauch, 1994**), y dañar los huevos que se pretende aislar. Sin embargo, si el contacto con la mezcla alcalina de hipoclorito no excede 10 minutos en total, no hay riesgo de daño químico. Este procedimiento permitió el aislamiento de huevos fértiles, encontrándose 70 a 80 % de ellos en perfecto estado (juveniles completos y móviles en el interior de los mismos) (Figura 11).

Las placas de agar ANGC inoculadas con células de *Xenorhabdus nematophila* en fase primaria son un sistema de cultivo de elaboración rápida y sencilla, que soporta el desarrollo, maduración y reproducción “in vitro” de *Steinernema carpocapsae*. Sobre el crecimiento masivo de células de *X. nematophila* se observó la rápida recuperación del 100% los II inoculados; dando lugar a estadios J4 o preadultos después de 24 horas. Adultos jóvenes de *S. carpocapsae* aparecen a la 48 horas, apreciándose estructuras que determinan el sexo de cada individuo. En las hembras se observó el desarrollo de la vulva en la región media del cuerpo, así como en el interior se desarrolló el útero; por su parte los machos presentaron espículas retráctiles en el parte caudal. A las 72 horas las hembras adultas alcanzaron su madurez reproductiva bajo las condiciones del experimento, momento en el que el útero se observó con

gran cantidad de embriones (Figura 10). El porcentaje de recuperación de los estadios IJ que se transformaron en hembras de primera generación, fue en promedio del 51%. La longitud promedio que alcanzaron las hembras fue de  $4932 \pm 308 \mu\text{m}$ , mientras que los machos tuvieron una longitud promedio de  $1814 \pm 81 \mu\text{m}$ . En las investigaciones donde se hace referencia a la obtención de huevos axénicos de nematodos entomopatógenos por lisis de adultos (**Lunau et al., 1993; Ehlers y Strauch, 1994**), no se presenta ningún dato al respecto del número de huevos aislados. **Patel y McFadden** (1978) lograron la axenización del nematodo de vida libre *C. elegans*. El aislamiento de adultos lo realizaron en cultivos “in vitro” en sustrato líquido. La lisis con NaOH al 0.4% por 3 horas y los lavados a altas velocidades de centrifugación (28 000 rpm) dieron como producto embriones, cuyo porcentaje de eclosión (fertilidad) solo alcanzo del 25 al 30 %.

La fertilidad de *S. carpocapsae* tuvo un valor promedio de  $89 \pm 3 \%$ . Este dato muestra que el método de lisis es un procedimiento seguro para el aislamiento de huevos fértiles de nematodos entomopatógenos. Solo un pequeño porcentaje no eclosionó, debido probablemente a daño químico o mecánico. Este método de axenización tiene ventajas con respecto a los procedimientos descritos por **Lunau et al.** (1993) y **Ehlers y Strauch** (1994), ya que evitó el uso de larvas de insectos para aislar nematodos adultos. Los investigadores mencionados obtuvieron adultos de la primera generación infectando larvas de último instar de *Galleria mellonella* con estadios IJ de *Steinernema*. Después de un lapso que según sus protocolos varía de 3 a 7 días, se hizo la disección de los cadáveres de los insectos para obtener hembras grávidas del nematodo a partir de las cuales se aislaron huevos axénicos. El procedimiento que llevamos a cabo hace innecesario discriminar la población de adultos, en hembras y machos, ya que ambos se lisaron sin dificultad usando hipoclorito alcalino.



En los experimentos realizados para lograr la sincronización y axenización de *S. carpocapsae*, los huevos después de aislarlos de hembras grávidas fueron sometidos a un solo lavado con la solución reguladora de fosfatos M1, se observó que la eclosión fue asincrónica, debido a la gran variabilidad en el grado de maduración (la maduración se determinó por el desarrollo embrionario que presentaban los huevos después de ser aislados). Es decir, la eclosión se presentó de manera desordenada ya que en un periodo de 48 horas apenas había eclosionado alrededor del 60% de nematodos en estadio J2. La eliminación de los restos celulares y huevos inmaduros se logró lavando el hidrolizado en repetidas ocasiones con solución M1, evidenciándose que el número de lavados lograba la eliminación de la mayor parte de los restos celulares procedentes de la lisis ya que con dos lavados el porcentaje de J2 alcanzó casi el 80 % a las 48 horas y en el mismo lapso aparecen hasta el 87 % de juveniles J2 cuando fueron tres los lavados hechos al hidrolizado (Figura 12A). Por otra parte cuando los lavados se realizaron con la solución reguladora de fosfatos M2 el porcentaje de juveniles J2 que eclosionaron después de 48 horas alcanzo el 98% aproximadamente cuando se realizaron tres lavados lo que significa que el número de lavados y la densidad de la solución de lavado son determinantes para lograr una eclosión sincrónica de nematodos (Figura 12B).

En los ensayos en que se usó radiación UV para inactivar a *X. nematophila* no se logró que los juveniles eclosionaran debido a que probablemente la radiación produce radicales libres en el medio de cultivo los cuales resultarán tóxicos para los huevos y estos últimos se lisan. Aunque se logró inactivar a la bacteria el método resultó inapropiado para la realización de las pruebas con compuestos tipo daumona ya que es necesario que los juveniles eclosionen del huevo, crezcan y se desarrollen (Tabla 6).

En los ensayos que se realizaron con antibióticos para inactivar las células de *X. nematophila* y así llevar a cabo los ensayos con compuestos tipo daumona, la fertilidad en todos los tratamientos, en general fue de aproximadamente 30 %. En estos tratamientos se usaron mezclas de ampicilina a 100 y 1000 µg, estreptomicina a 100 y 1000 µg y gentamicina a 100 y 1000 µg, si comparamos estas concentraciones con la LD50 en ratones de cada uno de los antibióticos, se sabe que es de 177.5 mg/kg, 262.3 mg/Kg y 430 mg/Kg respectivamente (**Index-Merck, 1989**), de manera que se puede suponer que las concentraciones usadas o bien la mezcla de los antibiótico causó un daño químico a la mayoría de los huevos y por esta razón solo se logró la eclosión y desarrollo de aproximadamente 30 % de los nematodos (Figura 13 y 14).

Con el fin de lograr un cultivo axénico de nematodos, se probó también el método en que se inocularon en medio complejo MBmHb. Los primeros procesos de cultivo axénico se desarrollaron para *Steinernema glaseri* y después para *Steinernema carpocapsae* (**Glaser, 1940**). El inóculo axénico fue obtenido por un meticuloso proceso de limpieza y desinfección aplicado a juveniles J3. Este inóculo se introdujo dentro de un medio simple de agar que contenía 1 g de riñón de conejo estéril en 10 ml de agar al 1%. Llegando a realizarse 14 transferencias (50 generaciones). Además se demostró que los nematodos también podían vivir y reproducirse en un medio líquido que contenía extracto de riñón. **Stoll** (1953) encontró que el extracto crudo de hígado, adicionado a infusiones de carne de ternera, permite en forma consistente obtener buenos rendimientos de *S. glaseri* en medio axénico en tubos de ensayo agitados a razón de 100 rpm. Además observó que la velocidad de agitación es un factor importante, ya que con velocidades de agitación menores se obtuvieron rendimientos bajos; mientras que velocidades de agitación muy elevadas, causaban deterioro de los nematodos.

Durante la década de los 60's, siguió sin identificarse la naturaleza del nutriente esencial requerido, propuesto por **Glaser** (1931), para los cultivos axénicos de nematodos. Inclusive se encontró que el nematodo de vida libre *Caenorhabditis briggsae*, también tenía requerimientos de “una preparación cruda de riñón en pequeñas cantidades”. Las técnicas de cultivo axénico se extendieron para *Steinernema carpocapsae*. Los estudios de **Buecher et al.** (1969, 1970), sobre *C. briggsae* se centraron sobre el rol de proteínas y hemoprecipitados que favorecían el crecimiento. **Rothstein** (1974), trabajando en investigaciones previas a las de **Hieb** (1968) y **Hieb et al.** (1970), reportó el efecto benéfico de la hemoglobina y del colesterol en un medio a base de levadura y peptona. **Vanfleteren** (1976) desarrolló un medio de cultivo barato para *Caenorhabditis elegans* y por primera vez reportó elevados rendimientos de nematodos para cultivos en fermentadores con capacidad de 10 litros. La aireación se hizo por burbujeo, y la suspensión fue lograda mediante una agitación lenta. **Pace et al.** (1986), reportaron que en un medio similar con agitación soportó el crecimiento de *S. carpocapsae*. Los estudios originales sobre el uso de factores hemoprecipitados (**Stoll, 1953, 1961**) fueron retomados más adelante. **Vanfleteren** (1978), él encontró que era necesario utilizar partículas de hemocomponentes para una producción eficiente de nematodos y que las células bacterianas vivas tenían un efecto benéfico. Finalmente **Lunau et al.** (1993) propusieron el medio complejo MbmHb y debido a la gran cantidad de nutrientes presentes en él se sustituye casi por completo a la bacteria de manera que la mayoría de los juveniles logran eclosionar y desarrollarse (Figura 15 y 16).

## VIII. CONCLUSIONES

- El *m*-cresol resultó tóxico para el nematodo *Steinernema carpocapsae* a las tres concentraciones probadas por lo que no se indujo la formación de infectivos juveniles.
- El ácido levulínico en la concentración de 0.5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$  no logró inducir la transformación al estadio IJ de *S. carpocapsae*, aunque este compuesto promovió el desarrollo del nematodo ya que conforme se aumento la concentración del compuesto, se observó un estadio de desarrollo mayor con respecto al testigo.
- Usando el  $\text{NH}_4^{+1}$  en la concentración 638888  $\mu\text{M}$ , 888888  $\mu\text{M}$  y 1138988  $\mu\text{M}$ , no se logró inducir la transformación al estadio IJ de *S. carpocapsae* y la concentración más alta resultó tóxica para el nematodo.
- El compuesto LY294002 a las concentraciones 1.45  $\mu\text{M}$ , 14.54  $\mu\text{M}$  y 145.43  $\mu\text{M}$  no indujo el estadio IJ en *S. carpocapsae* pero si retrasó el desarrollo del nematodo.
- En muestras de mosto de fermentación de un cultivo monoxénico de *Steinernema carpocapsae* provenientes de un reactor air-lift, se indujo la transformación del  $74 \pm 7\%$  IJ en 8 días de incubación, lo que indica que en el cultivo agotado hay alguna señal que induce la formación de la fase de infectivo juvenil a la mitad del tiempo comparado con el proceso normal de transformación.

## IX. PERSPECTIVAS

Como sugerencias para trabajos futuros relacionados con la presente investigación se recomienda realizar diferentes métodos analíticos como cromatografía de gases o cromatografía capilar en el medio de cultivo agotado de *Steinernema carpocapsae* con el fin de identificar y cuantificar los compuestos presentes. La purificación de los mismos sería deseable para determinar la estructura química de los compuestos responsables de la transformación al estadio IJ de *Steinernema carpocapsae*. Logrando la caracterización de estos compuestos sería posible agregarlos en el momento preciso en un cultivo de nematodos para disminuir drásticamente el costo de producción de bioinsecticidas a base de *S. carpocapsae*. Por otra parte resultaría sumamente interesante y aplicativo hacer pruebas para tratar de encontrar el momento idóneo de adición de cierta cantidad de medio de cultivo agotado al mosto de fermentación en un proceso de producción para lograr inducir la transformación de los nematodos al estadio IJ. Además conocer si en realidad está presente una daumona o la inducción se logra por el efecto conjunto de la presencia de la bacteria simbiote, los productos de excreción de los nematodos y las señales químicas presentes en el medio.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ❖ Ailion, M. 1999. Neurosecretory control of aging in *Caenorhabditis elegans*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 96: 7394-7397.
- ❖ Akhurst, R. J. 1980. Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp. bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoplectana* and *Heterorhabditis*. Journal of General Microbiology 121: 303-308.
- ❖ Akhurst, R. J. 1982. Antibiotic activity of *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes of the families Heterorhabditidae and Steinernematidae. Journal of General Microbiology 128: 3061-3068.
- ❖ Akhurst, R. J. and Boemare, M. E. 1986. A non-luminescent strain of *Xenorhabdus luminescens*. Journal of General Microbiology 132: 1917-1922.
- ❖ Akhurst, R. J. and Boemare, M. E. 1990. Biology and taxonomy of *Xenorhabdus*. pp. 75-87. In: R. Gaugler and H. Kaya. (eds.). Entomopathogenic nematodes in biological control. CRC Press, Boca Raton, Florida. 365 p.
- ❖ Alpuche, L. 1990. Los fungicidas. Aspectos generales. pp. 58-72. In: Albert L. (Coord.). Los plaguicidas. El ambiente y la Salud. Centro de Ecodesarrollo. México D.F. 331 p.
- ❖ Babar, P., Adamson, C., Walker, G., Walker, D. and Lithgow, G. 1999. P13-kinase inhibition induces dauer formation, thermotolerance and longevity in *C. elegans*. Neurobiology of Aging 20:513-519.

- ❖ Bedding, R. A. 1981. Low cost in vitro mass production of *Neoplectana* and *Heterorhabditis* species (Nematoda) for field control of insect pest. *Nematologica* 27: 109-114.
- ❖ Bedding, R.A. 1984. Large escale production, storage and transport of the insect parasitic nematodes, *Neoplectana* spp.and *Heterorhabditis* spp. *Annals of Applied Biology* 104: 117-121.
- ❖ Beyer, H., Walter, W. 1987. *Manual de Química Orgánica. Versión española de la 19ª Edición alemana.* Reverté. Barcelona, España. 985 p.
- ❖ Brehelin, M., Cherqui, A., Drif, L., Luciani, J., Akhurst, R., and Boemare, N. 1992. Ultrastructural study of surface components of *Xenorhabdus* sp. in different cell phases and culture conditions. *Journal of Invertebrate Pathology* 61:188-191.
- ❖ Buecher, E. J., Perez-Mendez, G. and Hansen E. L. 1969. The role of precipitation during activation treatments of grow factor for *Caenorhabditis briggsae*. *Experimental Biology and Medicine* 132: 724-731.
- ❖ Buecher, E. J., Hansen, E. L., and Yarwood, E. A. 1970. Growth of nematodes in defined medium containing hemin and supplemented whit commercially available proteins, *Nematologica* 16: 403-409.
- ❖ Chavarria, H. N., Espino, G. J., Sanjuan, G. R. and Rodríguez, H. A. 2006. Monoxenic liquid culture of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* using a culture medium containing whey. Kinetic and modeling. *Journal of Biothecnology* 125: 75-84.

- ❖ Chitwood, B. G. and Chitwood, M. B. 1974. Introduction to Nematology. University Park Press, Baltimore, Maryland. 334 p.
- ❖ Ehlers, R. and Strauch, O. 1994. Establishment of axenic and monoxenis cultures summary of a practical workshop session. pp. 204-207. In: A.M. Burnell, R.U. Ehlers and J. P. Masson. (eds.) Genetics of entomopathogenic nematode-bacterium complex, European Commission directorate-general XII, Science, Research and Development Enviroment Research Programme. Bruselas, Bélgica. 277 p.
- ❖ Fodor, A. 1994. Genetic and molecular aspects of dauer larva formation and recovery. pp. 23-40. In: A.M. Burnell, R.U. Ehlers and J. P. Masson. (eds.) Genetics of entomopathogenic nematode-bacterium complex, European Commission directorate-general XII, Science, Research and Development Enviroment Research Programme. Bruselas, Bélgica. 277 p.
- ❖ Gaugler, R. and Kaya, H. 1990. Entomopathogenic nematodes in biological control. CRC Press. Boca Raton, FL. USA. 364 p.
- ❖ Georgis, R. 1990. Formulation and application technology. pp. 173-187 In: R. Gaugler and H. Kaya. (eds.). Entomopathogenic nematodes in biological control. CRC Press, Boca Raton, Florida. 365 p.
- ❖ Georgis, R. and Gaugler, R. 1991. Predictability in biological control using entomopathogenic nematodes. Journal of Economic Entomology 84: 713-720.
- ❖ Georgis, R. and Hage, N. 1991. Nematodes as biological insecticides. Pestic. Outlook 2: 29-32.
- ❖ Glaser, R. W. 1931. The cultivation of a nematode parasite of an insect. Science 73: 614-619.



- ❖ Glaser, R. W. 1940. The bacteria-free culture of a nematode parasite. *Experimental Biology and Medicine* 43: 512-519.
- ❖ Golden, W. J. and Riddle L. D. 1982. A pheromone influences larval development in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science* 218:578-580.
- ❖ Golden, W. J. and Riddle L. D. 1984a. The *Caenorhabditis elegans* dauer larva: Developmental effects of pheromone, food, and temperature. *Developmental Biology* 102:368-378.
- ❖ Golden, W. J. and Riddle L. D. 1984b. A pheromone-induced developmental switch in *Caenorhabditis elegans*: Temperature-sensitive mutants reveal a wild-type temperature-dependent process. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81:819-823.
- ❖ Hieb, W. F. and Rothstein, M. 1968. Sterol requirement for reproduction of a free-living nematode. *Science* 160: 778-784.
- ❖ Hieb, W. F., Stokstad, E. L. R., and Rothstein, M. 1970. Heme requirements for reproduction of a free-living nematode. *Science* 168: 143-149.
- ❖ Index Merck. 1989. An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 11th Edition. USA. 1606 p.
- ❖ Instituto Nacional de Ecología. SEMARNAP. 2000. La evaluación del impacto ambiental. 1a Edición. México D.F., México. 160 p.
- ❖ Ishibashi, N. and Kondo, E. 1990. Behavior of infective juveniles. pp. 47-62. In: *Biological Control*. CRC Press. Boca Raton, FL. 365 p.
- ❖ Kaya H. and Gaugler, R. 1993. Entomopathogenic nematodes. *Annual Review of Entomology* 38: 181-206.

- ❖ Kaya H. and Simmann, G. 1987. Parasitic nematodes in biological control of insects pests. University of California, Berkely, CA. USA. 2 p.
- ❖ Klein, M. 1990. Efficacy against soil-inhabiting insect pests. pp. 195-210. In: R. Gaugler and H. Kaya. (eds.). Entomopathogenic nematodes in biological control. CRC Press, Boca Raton, Florida. 365 p.
- ❖ Kurzchalia, T. and Ward, S. 2003. Why do worms need cholesterol? Nature Cell Biology 5: 684-688.
- ❖ Latha, S. and Chang, F. 1993. Antimicrobial activity and biosynthesis of indole antibiotics produced by *Xenorhabdus nematophilus*. Journal of General Microbiology 139: 3139-3148.
- ❖ Leisman, G., Wuakau, J. and Forst, S. 1995. Characterization and environmental regulation of outer membrane proteins in *Xenorhabdus nematophilus*. Applied and Environmental Microbiology 61: 200-204.
- ❖ Ling-Sheu, M., Ming-Ho, F., Fang-Chao, K., Liang-Kuo, M. And Hwa-Lui, S. 2004. Activation of phosphoinositide 3-kinase in response to high glucose leads to regulation of reactive oxygen species–Related Nuclear factor- $\kappa$ B activation and cyclooxygenase expression in mesangial cells. Molecular Pharmacology 66:187-196.
- ❖ Lunau, S., Stoessel, S., Schmidt-Peisker, A. J., and Ehlers, R. U.1993. Establishment on monoxenic inocula for scaling up *in vitro* cultures of the entomopathogenic nematodes *Steinernema* spp. and *Heterorhabditis* spp. Nematologica 39: 385-399.

- ❖ Mahar, A., Munir, M., Elawad, S., Gowen, S. and Hague, N. 2005. Pathogenicity of bacterium, *Xenorhabdus nematophila* isolated from entomopathogenic nematode (*Steinernema carpocapsae*) and its secretion against *Galleria mellonella* larvae. *Journal of Zhejiang University Science* 6: 457-463.
- ❖ Maggenti, A. 1981. *General Nematology*. Springer-Verlag. USA. 362 p.
- ❖ Maxwell, P. W., Chen, G., Webster, J. M., and Dunphy, G. B. 1993. Stability and activities of antibiotics produced during infection of the insect *Galleria mellonella* by two isolates of *Xenorhabdus nematophilus*. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 715-721.
- ❖ Miras-Portugal, M.T. 2006. Receptores de feromonas de mamíferos: supervivencia y sexualidad. *Anales de la real Academia Nacional de Farmacia* 72:489-517.
- ❖ Nelson, D., Cox, M. 1998. *Principios de Bioquímica de Lehninger*. Segunda Edición. Omega. Wisconsin, USA. 1013 p.
- ❖ Pace, G. W., Grote, W., Pitt, D. E., and Pitt, J. M. 1986. Liquid culture of nematodes, Int. Patent WO 86701074.
- ❖ Pan-Young, J., Mankil, J., Yong-Hyeon, Y., Heekyeong, K., Moonsoo, P., Eunmi, H., Weontae, L., Young Hwan, K., Kun, K., and Young-Ki, P. 2005. Chemical structure and biological activity of the *Caenorhabditis elegans* dauer-inducing pheromone. *Nature* 433: 541-545.
- ❖ Patel, T. R., and McFadden, B. A. 1978. Axenic and synchronous cultures of *Caenorhabditis elegans*. *Nematologica* 24: 51-62.

- ❖ Poinar, G. O. Jr. 1990. Biology and Taxonomy of Steinernematidae and Heterorhabditidae. pp. 23-58. In: R. Gaugler and H. Kaya. (eds.). Entomopathogenic nematodes in biological control. CRC Press, Boca Raton, Florida. 365 p.
- ❖ Poinar O.G., Jr. and Himsworth, P. T. 1967. *Neoplectana* parasitism of larvae of the greater wax moth, *Galleria mellonella*. Journal of Invertebrate Pathology 9: 241-246.
- ❖ Popiel, L. and Hominick, W. 1992. Nematodes as biological control agents: Part. II. Advances in Parasitology 31: 381-433.
- ❖ Popiel, I., Grove, D. L. and Friedman, M. J. 1989. Infective juvenile formation in the insect parasitic nematode *Steinernema feltiae*. Parasitology 99: 77-81.
- ❖ Rodgers, B., Goodliman, J. and Pearce, J. 1992. Mass production of entomopathogenic nematodes. 25<sup>th</sup> Annual Meeting Society for Invertebrate Pathology. Heidelberg, Germany. 74:197.
- ❖ Riddle, D. and Albert, P. 1997. Genetic and environmental regulation of dauer larva development. pp. 538-612. In: Riddle, D. Blumenthal, T., Meyer, B. and Priess, J. (eds) *C. elegans II*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA. 1222 p.
- ❖ Rothstein, M. 1974. Practical methods for the axenic cultures of the free-living nematodes *Turbatrix aceti* and *Caenorhabditis briggsae*. Comparative Biochemistry and Physiology 49B: 669-674.
- ❖ SAGAR. 1999. Potencial de uso de nematodos entomopatógenos en México. Ficha Técnica CB-05. Centro Nacional de Referencia de Control Biológico. 4 p.

- ❖ San-Blas, E., Gowen, S. and Pembroke, B. 2008. *Steinernema feltiae*: Ammonia triggers the emergence of their infective juveniles. *Experimental Parasitology* 119: 180-185.
- ❖ Soler, M.D., Gómez, L., Sánchez, L. 2003. Formulación de nematodos entomopatógenos. *Revista de Protección Vegetal* 18:7-14.
- ❖ Stoll, N. R. 1953. Axenic cultivation of the parasitic nematode, *Neoplectana glaseri*, in a fluid medium containing raw liver extract. *Journal of Parasitology* 39: 422-426.
- ❖ Stoll, N. R. 1961. Favored RLE for axenic culture of *Neoplectana glaseri*, *Journal of Helminthology* 65:169-177.
- ❖ Suárez, S. J. 1997. Caracterización cinética de un cultivo monoxénico en medio sumergido para la propagación masiva del nemátodo entomopatógeno *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae). Tesis Profesional. Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec. Estado de México. 80 p.
- ❖ Suárez, S. J. 2002. Evaluación de la demanda específica de oxígeno en cultivo sumergido del nematodo entomopatógeno *Steinernema feltiae* y de su bacteria simbionte *Xenorhabdus nematophilus*. Tesis de Maestría, CINVESTAV-IPN, México. 73 p.
- ❖ Surrey M. R., and Davies, R. J. 1996. Pilot-scale liquid culture and harvesting of an entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis bacteriophora*. *J. Invert. Pathol.* 67:92-99.
- ❖ Vanfleteren. J. R. 1976. Large scale cultivation of free-living nematode (*Caenorhabditis elegans*). *Experientia* 32: 1087-1095.

- ❖ Vanfleteren, J. R. 1978. Axenic culture of free-living, plant-parasitic and insect-parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology* 16: 131-137.
- ❖ Volgyi, A., Fodor, A., Sztirmai, A. and Forst, S. 1998. Phase variation in *Xenorhabdus nematophilus*. *Applied and Environmental Microbiology* 64:1188-1193.
- ❖ Weinstein, P. 1960. Excretory mechanisms and excretory products of nematodes: an appraisal. In: Stauber, L.A. (ed.) *Host influence on parasite physiology*. Rutgers University Press, New Brunswick.
- ❖ Woodring, J. and H.K. Kaya. 1988. *Steinernematid and Heterorhabditid nematodes: A Handbook of Biology and Techniques*. University of California. USA. 30 p.
- ❖ Woust, M. W. 1991. *Steinernema (Neoplectana) and Heterorhabditis* Species. Pp.855-897. In: Nickle, R., W. (ed.) *Manual of Agricultural Nematology*. Marcel Dekker, USA. 1035 p.
- ❖ Wright, D. J. 1998. Respiratory physiology, nitrogen excretion and osmotic and ionic regulation. pp. 103-131. In: Perry, R. N., Wright, D. J. (eds.). *The physiology and biochemistry of free-living and plant-parasitic nematodes*. CAB International, Wallingford, UK.438 p.
- ❖ Wright, D. J. and Newall, D. R. 1976. Nitrogen excretion, osmotic and ionic regulation in nematodes. pp. 132-195 In: Croll, N.A. (ed.) *The organization of nematodes*. Academic Press, New York, USA. 547 p.

## ANEXO I

### Soluciones y medios de cultivo.

**CST:** Caldo Soya Trypticaseína (BIOXON)

**AN:** Agar Nutritivo (BIOXON)

**ANGC:** Agar Nutritivo con Grasa de Cerdo (**Suárez, 1997**)

Agar nutritivo (BIOXON)	23.0 g
Grasa de cerdo	25.0 g
Agua destilada	1000 mL

**MB: Medio basal (Lunau *et al.*, 1993)**

Caldo Soya Trypticaseína (Bioxon)	40.0 g
Agua destilada	1000 mL

**MBmHb: Medio basal modificado con Hemoglobina (Lunau *et al.*, 1993)**

Caldo Soya Trypticaseína (Bioxon)	40.0 g
Extracto de levadura (Sigma)	30.0 g
Hemoglobina de caballo	1.0 g
Colesterol (Sigma)	0.2 g
Agua destilada	1000 mL

**CN:** Caldo nutritivo (BIOXON).

**NBTA:** Agar nutritivo con azul de bromotimol (BTB) y cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) (Akhurst y Boemare, 1986).

Agar nutritivo (BIOXON)	23.0 g
Azul de bromotimol (Sigma)	0.025 g
Cloruro de trifeniltetrazolio (Sigma)	0.04 g
Agua destilada	1000 mL

**Dieta para *Galleria mellonella*** (Woodring y Kaya, 1988)

Ca(CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> COO) <sub>2</sub>	1.5 g
Levadura de cerveza	1 cdta.
Agua	100 mL
Miel	200 mL
Glicerina	200 mL
Vitaminas	12 mL
Salvado	2400 mL

**SDm (Surrey y Davis, 1996)**

Extracto de levadura	2.3 g
Yema de huevo	0.25g
Aceite de maíz	4 mL
NaCl	0.5 g
H <sub>2</sub> O destilada	100 mL

**Solución reguladora de fosfatos M1 [ $\rho= 1.076 \text{ g/cm}^3$ ] (Suárez, 2002)**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6.0 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.25 g
NaCl	5.0 g
H <sub>2</sub> O destilada	1000 ml



**Solución reguladora de fosfatos M2 [ $\rho= 1.157 \text{ g/cm}^3$ ] (Suárez, 2002)**

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	6.0 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	12.0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5 g
NaCl	10.0 g
H <sub>2</sub> O destilada	1000 ml

**Medio Mineral YS (Ehlers y Strauch, 1994)**

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.5 g
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	0.5 g
NaCl	5.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
H <sub>2</sub> O destilada	1000 ml