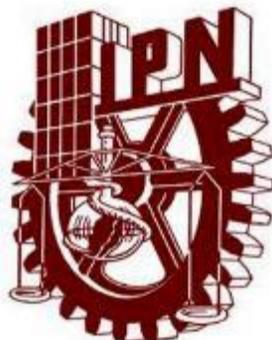


**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**



**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL DESARROLLO  
INTEGRAL REGIONAL UNIDAD OAXACA**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE  
RECURSOS NATURALES**

**“Manejo biológico del gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* Smith) con  
nematodos entomopatógenos + adherentes en maíz (*Zea mays*).”**

**T E S I S**

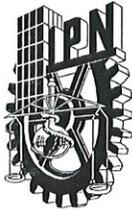
**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO EN CIENCIAS**

**(PRODUCCIÓN Y PROTECCIÓN VEGETAL)**

**PRESENTA:  
GABRIELA CASTRUITA ESPARZA**

**DIRECTOR DE TESIS  
DR. TEODULFO AQUINO BOLAÑOS**

**SANTA CRUZ XOXOCOTLÁN, OAXACA, NOVIEMBRE 2017**



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

## ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez siendo las 11:00 horas del día 04 del mes de septiembre del 2017 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-OAXACA para examinar la tesis titulada:

Manejo biológico del gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* Smith) con nematodos entomopatógenos + adherentes en maíz (*Zea mays*).

Presentada por el alumno (a):

Castruita	Esparza	Gabriela							
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)							
		Con registro:	B	1	5	0	9	1	3

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Conservación y Aprovechamiento de Recursos Naturales

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISIÓN REVISORA

Director(a) de tesis

Dr. Teodulfo Aquino Bolaños

Dr. Jaime Ruíz Vega

M. en C. Laura Martínez Martínez

Dr. José Antonio Sánchez García

Dr. David Martínez Sánchez

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Salvador Isidro Belmonte Jiménez



CENTRO INTERDISCIPLINARIO  
DE INVESTIGACIÓN PARA EL  
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL  
C.I.I.D.I.R.  
UNIDAD OAXACA  
I.P.N.



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de México, D.F. el día 24 del mes de noviembre del año 2017, el (la) que suscribe CASTRUITA ESPARZA GABRIELA alumno(a) del Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES, con número de registro B150913, adscrito(a) al **Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca**, manifiesto(a) que es el (la) autor(a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del (de la, de los) **Dr. Teodulfo Aquino Bolaños** y cede los derechos del trabajo titulado **“Manejo biológico del gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* Smith) con nematodos entomopatógenos + adherentes en maíz (*Zea mays*)”**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del (de la) autor(a) y/o director(es) del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones posgradoax@hotmail.com ó gabicastruita@gmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

CASTRUITA ESPARZA GABRIELA

Nombre y firma del alumno(a)



CENTRO INTERDISCIPLINARIO  
DE INVESTIGACIÓN PARA EL  
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL  
C.I.I.D.I.R.  
UNIDAD OAXACA  
I.P.N.

## RESUMEN

El gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* Smith) es la principal plaga en cultivo maíz ocasionando pérdidas y daños que oscilan del 30 al 50 %. Actualmente para controlar a esta plaga se utilizan insecticidas que tienen efectos negativos para la salud y el medio ambiente. En este estudio se evaluó un método de control biológico a base de nematodos entomopatógenos + adherentes en maíz, que permitan prolongar la sobrevivencia de nematodos en laboratorio y campo para el manejo de *S. frugiperda*. Los tratamientos se formularon con dos adherentes (aceite de oliva y aceite de coco), cuatro cepas de nematodos (*Heterabditis bacteriophora*, *Steinernema websteri*, *S. carpocapsae* y *S. colombiense*) a tres concentraciones 200, 400 y 600 nem/larva en condiciones de laboratorio. Además se determinó la dosis letal (DL<sub>90</sub>) de cada cepa mediante un análisis de Probit que se aplicaron en campo. El tratamiento con *H. bacteriophora* y *S. websteri* las que presentaron mayor efectividad del 100 % a concentraciones de 200 nem/larva de último instar. Se encontró que los adherentes prolongaron la sobrevivencia de los nematodos entomopatógenos por siete días, ampliando el periodo de infectividad. La aplicación de la DL<sub>90</sub> en campo logró un control del 67% de la población de larvas de *S. frugiperda* de último instar en el cultivo de maíz, durante la etapa vegetativa V6 – V8, la incorporación de adherentes permite prolongar la vida de dichos microorganismos y aumenta su fijación a *S. frugiperda* plaga de maíz. Además de que la incorporación de adherentes mostró tener efecto positivo para el almacenamiento del nematodo *S. colombiense* a 4, 8, 14 y 20 °C por tres semanas.

**Palabras clave: efectividad, adherentes, concentración**

## ABSTRACT

The fall armyworm (*Spodoptera frugiperda* Smith) is the main pest in maize crop causing losses and damages ranging from 30 to 50%. Currently insecticides are used to control this pest and have negative effects on health and the environment. This study assessed a method of biological control based on entomopathogenic nematodes + adherents in maize, that allow to prolong the survival of nematodes in laboratory and field for the management of *S. frugiperda*. The treatments were formulated with two adherents (olive oil and coconut oil), four nematode strains (*Heterorhabditis bacteriophora*, *Steinernema websteri*, *S. carpocapsae* and *S. colombiense*) at three concentrations of 200, 400 and 600 nem/larva under conditions of laboratory. In addition, the lethal dose (LD<sub>90</sub>) of each strain was determined by a Probit analysis that was applied in the field. The treatment with *H. bacteriophora* and *S. websteri* showed the highest effectiveness of 100% at concentrations of 200 nem / larva of last instar. The adherents were found to prolong the survival of the entomopathogenic nematodes for seven days, extending the period of infectivity. The application of DL<sub>90</sub> in the field reached a control of 67% of the population of *S. frugiperda* larvae of last instar in the maize crop, during the vegetative stage V6 - V8, the incorporation of adherents allows to prolong the life of previously mentioned microorganisms and increases its attachment to *S. frugiperda* corn pest. Furthermore, the incorporation of adherents showed a positive effect for the storage of the *S. colombiense* nematode at 4, 8, 14 and 20 ° C for three weeks.

**Key words: effectiveness, adherents, concentration**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Instituto Politécnico Nacional y al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría y permitirme formar parte del Programa Institucional de Formación de Investigadores del IPN.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo brindado en la realización de mis estudios de maestría.

Al Dr. Teodulfo Aquino Bolaños, por dirigir el presente trabajo de investigación, ya que con su amplia experiencia en laboratorio y campo me supo guiar para lograr concluir en tiempo y forma mi tesis.

A la M en C. Laura Martínez Martínez. Por sus enriquecedoras contribuciones y consejos a lo largo de dos años de trabajo.

Al Dr. David Martínez Sánchez por su asesoría y sugerencias en cada uno de los seminarios.

Al Dr. Jaime Ruíz Vega miembro del comité revisor, por su atinada asesoría y sus revisiones al escrito, contribuyendo siempre a enriquecer el presente trabajo con su amplio conocimiento en el tema.

Al Dr. José Antonio Sánchez García miembro del comité revisor por sus observaciones.

Al Dr. José Luis Chávez Servia por su asesoría y paciencia en resolver mis dudas en el área estadística.

Al Dr. Isidro Morales García por su asesoría en el análisis estadístico de los resultados obtenidos.

Al Dr. Gabino Alberto Martínez Gutiérrez por su apoyo en la fase experimental.

A Dra. Yolanda Donají Ortiz Hernández por su orientación en el trabajo de investigación.

A mis compañeros del CIIDIR y a cada una de las personas que colaboraron para la obtención de esta tesis.

## **DEDICATORIA**

A mis padres Isabel Esparza e Ismael Castruita que han sido parte fundamental para mi crecimiento personal y profesional, al brindarme siempre un ejemplo de lucha, trabajo, disciplina y respeto.

A mis hermanos Luis, Liliana, Miguel, Ricardo e Isabel porque siempre me han apoyado y confiado en mí.

A todos mis compañeros del CIIDIR que de alguna manera me apoyaron y me hicieron sentir en casa durante mi estancia en Oaxaca.

## ÍNDICE

RESUMEN .....	i
ABSTRACT .....	ii
AGRADECIMIENTOS .....	iii
DEDICATORIA.....	v
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS.....	3
2.1. Objetivo General .....	3
2.2. Objetivos Específicos.....	3
III. HIPÓTESIS .....	4
IV. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
4.1. Importancia del maíz.....	5
4.2. Plagas del maíz.....	6
4.2.1. Otras plagas de menor incidencia.....	6
4.3. Control de plagas .....	7
4.3.1. Control de <i>Spodoptera frugiperda</i> en el mundo con enemigos naturales	8
4.3.2. Control de <i>Spodoptera frugiperda</i> en México .....	9
4.4. Biología de <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	10
4.4.1. Hábitos.....	11
4.4.2. Daños .....	12
4.5. Antecedentes del control biológico .....	12
4.5.1. Historia del control biológico en México.....	14
4.5.2. Definiendo el control biológico .....	16
4.5.3. Métodos de control biológico .....	17
4.5.4. Control biológico clásico .....	17

4.5.5. Control biológico por aumento .....	18
4.5.6. Control biológico por conservación .....	19
4.6. Controladores biológicos.....	19
4.6.1. Control biológico de plagas mediante nematodos entomopatógenos...	20
4.6.2. Nematodos entomopatógenos .....	23
4.6.3. Ciclo de vida .....	24
4.6.4. Modo de entrada.....	24
4.6.5. Comportamiento de búsqueda.....	25
4.6.6. Modo de acción.....	25
4.6.7. Sintomatología .....	25
4.6.8. Aplicación foliar .....	26
V. MATERIALES Y METODOS.....	27
5.1. Localización del área de estudio .....	27
5.2. Obtención y reproducción de material biológico (nematodos entomopatógenos y larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> ). .....	28
5.2.1. Reproducción de nematodos entomopatógenos .....	28
5.2.2. Cámaras húmedas.....	29
5.2.3. Recolección de larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> en plantas de maíz ..	30
5.3. Obtención y evaluación de adherentes con características de viscosidad e hidratación. ....	30
5.3.1 Tiempo de desecación de adherentes en condiciones de laboratorio ...	32
5.4. Supervivencia de nematodos entomopatógenos en diferentes adherentes	33
5.5. Efectividad de nematodos entomopatógenos + adherentes sobre larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> en condiciones de laboratorio.....	35
5.6. Efectividad de la DL <sub>90</sub> de nematodos entomopatógenos + adherentes en plantas de maíz.....	37

5.6.1. Distribución experimental.....	38
5.6.2. Análisis estadístico .....	39
5.7. Evaluación de la vida de anaquel de la suspensión de nematodos <i>S. colombiense</i> + adherentes.....	40
5.7.1. Análisis estadístico .....	41
VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	42
6.1. Obtención y evaluación de adherentes con características de viscosidad e hidratación .....	42
6.2. Sobrevivencia de los nematodos <i>S. carpocapsae</i> y <i>S. colombiense</i> en tres adherentes.....	44
6.3. Efectividad en larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> con nematodos entomopatógenos + adherentes en condiciones de laboratorio.....	50
6.4. Evaluación de la DL <sub>90</sub> de nematodos entomopatógenos + adherentes en plantas de maíz.....	53
6.5. Evaluación de la vida de anaquel de la suspensión de nematodos <i>S. colombiense</i> + adherentes.....	58
VII. CONCLUSIONES .....	63
VIII. RECOMENDACIONES .....	64
IX. LITERATURA CITADA.....	65

### ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Duración del ciclo biológico de <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	11
Cuadro 2. Número de días que permanece en cada estadio .....	11
Cuadro 3. Especies benéficas y de entomopatógenos más comunes que atacan a <i>Spodoptera frugiperda</i> (García & Tarango, 2009).....	20
Cuadro 4. Evaluación de adherentes con características de viscosidad e hidratación.....	31

Cuadro 5. Evaluación de sobrevivencia de dos cepas de nematodos entomopatógenos en laboratorio en adherentes.....	34
Cuadro 6. Evaluación de nematodos entomopatógenos en larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> en condiciones de laboratorio. ....	35
Cuadro 7. Tratamientos aplicados en campo.....	38

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación campo experimental del CIIDIR IPN unidad Oaxaca.....	27
Figura 2. A) Inoculación de NEPs en larvas de <i>G. mellonella</i> . B) Muerte y reproducción de nematodos entomopatógenos en cámaras húmedas en larvas de <i>G. mellonella</i> . ....	29
Figura 3. Monitoreo de emergencia de IJs.....	29
Figura 4. Longitud media de larvas de cuarto instar.....	30
Figura 5. A) Raspado para la extracción de sabia. B) Molienda de sabia para homogenización de la mezcla. C) Obtención de adherentes en condiciones de laboratorio. ....	32
Figura 6. A) Portaobjetos con adherentes sobre servitoallas humedecidas. B) Portaobjetos con adherentes sobre servitoallas humedecidas al tercer día.....	33
Figura 7. Conteo de nematodos en adherentes.....	34
Figura 8. Alimentación de larvas de <i>S. frugiperda</i> antes de la inoculación.....	36
Figura 9. Traslado de larvas vivas y muertas a laboratorio.....	39
Figura 10. A) Preparación de suspensión B) Colocación de IJs C) Almacenamiento de suspensión de nematodos + adherentes a diferentes temperaturas en placas multiwell.....	40
Figura 11. A) Colocación de larvas <i>G. mellonella</i> para evaluar la efectividad de los nematodos entomopatógenos B) Registro del tiempo de mortalidad en larvas.....	41
Figura 12. Permanencia de adherentes en días. Diferentes letras en columnas indican diferencias significativas (Tukey, $p \leq 0.05\%$ ). ....	43

Figura 13. Supervivencia de dos cepas de nematodos entomopatógenos en tres adherentes. Diferentes letras en líneas indican diferencias significativas (Tukey, $p \leq 0.05\%$ ).....	49
Figura 14. Supervivencia de dos nematodos entomopatógenos a diferentes tiempos en adherentes. Diferentes letras en columnas indican diferencias significativas (Tukey, $p \leq 0.05\%$ ).....	50
Figura 15. Control (%) encontrado en larvas de <i>S. frugiperda</i> en condiciones de laboratorio a las 24 h. Diferentes letras en barras indican diferencias significativas (Tukey, $p \leq 0.05\%$ ). * HB ( <i>H. bacteriophora</i> ), SCL ( <i>S. colombiense</i> ), S.C ( <i>S. carpocapsae</i> ), SW ( <i>S. westeri</i> ).....	51
Figura 16. Control (%) encontrado en larvas de <i>S. frugiperda</i> en condiciones de laboratorio a las 48 h. Diferentes letras en barras indican diferencias significativas (Tukey, $p \leq 0.05\%$ ). * HB ( <i>H. bacteriophora</i> ), SCL ( <i>S. colombiense</i> ), S.C ( <i>S. carpocapsae</i> ), SW ( <i>S. westeri</i> ).....	52
Figura 17. % de Control de <i>S. frugiperda</i> encontrado en campo. Kruskal Wallis ( $p \leq 0.05\%$ ).....	54
Figura 18. A) Larvas encontradas vivas B) Traslado de larvas a laboratorio y seguimiento de su ciclo biológico C) El seguimiento finalizó cuando las larvas se convirtieron en pupas y emergieron adultos de <i>S. frugiperda</i> . ....	57
Figura 19. % de control encontrado en larvas de <i>G. mellonella</i> al almacenar la suspensión de <i>S. colombiense</i> a diferentes temperaturas. ....	58
Figura 20. % de control encontrado en <i>G. mellonella</i> al ser expuestas a una suspensión de <i>S. colombiense</i> almacenada a diferentes días. ....	60
Figura 21. % de control de larvas de <i>G. mellonella</i> en función del adherente empleado.....	61
Figura 22. A) Monitoreo de unidades experimentales diariamente durante cuatro días. B) Conteo y separación de larvas muertas.....	61

## I. INTRODUCCIÓN

En México, la plaga de mayor incidencia en el maíz es el gusano cogollero (*S. frugiperda*). Las larvas se localizan en las plantas en crecimiento, donde se alimentan de las hojas en formación las cuales al desarrollarse quedan perforadas y rasgadas, mientras que el ataque temprano afecta el desarrollo de la misma, inclusive puede provocarle la muerte. Por otro lado se tienen estudios que demuestran la resistencia de *S. frugiperda* a diversos agroquímicos (Castro *et al.*, 2012; León-García *et al.*, 2012), mismos que dejan residuos en los productos agrícolas, generan contaminación ambiental e intoxicaciones al productor, lo cual ya se ha convertido en un problema mundial (Samish & Glazer, 2001; Choi *et al.*, 2012; Del Valle *et al.*, 2013; Caccia *et al.*, 2014; Gianfelici *et al.*, 2014).

Una alternativa al uso de plaguicidas es el control biológico, el cual es definido por Hajek (2004) como “la acción de parasitoides, depredadores o patógenos para mantener la densidad de población de otro organismo (plaga) a un promedio más bajo de lo que ocurriría en su ausencia”. Muchos patógenos son conocidos como enemigos naturales y pueden causar epizootias (altos niveles de enfermedad) en poblaciones de hospederos (Hajek, 2004). Una opción es el uso de nematodos entomopatógenos (NEPs), ya que las larvas de *S. frugiperda* son muy susceptibles a la infección por microorganismos como hongos y nematodos entomopatógenos, los cuales son factibles para ser utilizados en control biológico microbiano (Gianfelici *et al.*, 2014). Además, han sido estudiados y evaluada su efectividad sobre larvas del picudo del agave (*Scyphophorus acupunctatus*) y diferentes especies de insectos (Batalla-Carrera *et al.*, 2014); Lo cual marca la pauta para experimentar en maíz y

llevar a cabo esta investigación con el objetivo de disminuir las pérdidas en maíz ocasionadas por *S. frugiperda*, utilizando como manejo el uso de nematodos entomopatógenos + adherentes que incrementen su fijación en el follaje de la planta de maíz y así incrementar el tiempo de contacto con larvas de *S. frugiperda* en campo.

## II. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo General

Determinar la efectividad de nematodos entomopatógenos asociados a diferentes adherentes para el control del gusano cogollero (*S. frugiperda*) en el cultivo de maíz

### 2.2. Objetivos Específicos

1. Evaluar diferentes adherentes con características de viscosidad e hidratación.
2. Evaluar el efecto de los nematodos entomopatógenos, *S. colombiense*, *S. carpocapsae*, *S. websteri*, y *H. bacteriophora* a 200, 400 y 600 nem/larva para el manejo de larvas de cuarto instar de *S. frugiperda* en condiciones de laboratorio.
3. Determinar la efectividad de la DL<sub>90</sub> de las cepas sobresalientes de nematodos entomopatógenos + adherentes en plantas de maíz en etapa V6 – V8 en campo.
4. Determinar la vida útil de la suspensión de nematodos entomopatógenos *S.colombiense* + adherentes a diferentes temperaturas.

### III. HIPÓTESIS

Ho: La aplicación de nematodos entomopatógenos + adherentes en larvas de cuarto instar de *Spodoptera frugiperda* Smith en plantas de maíz, tendrá un efecto en la reducción de la presencia de larvas de *S. frugiperda*, favoreciendo así el desarrollo del cultivo de maíz al igual que si se usara un insecticida químico.

Ha: La aplicación de nematodos entomopatógenos + adherentes en larvas de cuarto instar de *Spodoptera frugiperda* Smith en plantas de maíz, no tiene un efecto en la reducción de la presencia de larvas de *S. frugiperda*, tampoco mejora el desarrollo del cultivo de maíz, como el uso de un insecticida químico.

## IV. REVISIÓN DE LITERATURA

### 4.1. Importancia del maíz

El maíz (*Zea mays* L.), es uno de los granos alimenticios más antiguos que se conocen, fue domesticado por el hombre desde tiempos remotos y han evolucionado juntos a través de la historia, convirtiéndose así en el cultivo que hoy en día brinda la fuente principal de empleo y alimentación de millones de familias campesinas de México (Fernández *et al.*, 2012).

México es considerado centro de origen del maíz, ya que posee una gran diversidad genética en sus razas locales; es el cultivo nacional por excelencia y se encuentra distribuido en todos los estados, climas y altitudes. Son diversas variedades las que se consumen de diferentes formas. Además la importancia de este cultivo no solo radica en los aspectos económicos y comerciales, sino que también tiene un gran valor cultural, simbólico y espiritual (Polanco & Flores, 2008). Uno de los estados donde se concentra la mayor diversidad de maíz de colores es en Oaxaca, encontrando un 63% de grano blanco, 20% amarillo, 7% azul y 5% rojo (Aragón *et al.*, 2006). Mismos que tienen una gran aceptación por parte del consumidor y que se encuentran en todo el territorio de la República Mexicana (Sánchez, 2001).

Con respecto al consumo nacional de grano de maíz, se determinó que en 2014 fue de 33 millones de toneladas anuales, de los cuales 12 millones fueron consumidos directamente como alimento, mientras que 21 millones de toneladas se usan como forraje, materia prima industrial, semilla o son mermas de almacén (Fernández *et al.*, 2012).

Debido a la suma importancia que tiene este cultivo para los mexicanos y a las pérdidas que presenta, es necesario protegerlo de las principales plagas que lo afectan. Es bien sabido que la protección de cultivos juega un papel vital en la producción agrícola contemporánea. Sin embargo en la actualidad se basa principalmente en el uso de productos químicos y se calcula que un 37 % de la producción agrícola mundial se pierde debido a plagas y enfermedades (Martínez, 2000).

## **4.2. Plagas del maíz**

Al gusano cogollero se conoce técnicamente como *S. frugiperda*, pertenece al orden Lepidóptera, familia Noctuidae y es considerado como la plaga más importante del cultivo de maíz en México (Dequech *et al.*, 2004). Este es de los pocos insectos que se dispersan y reproducen a través de todo el continente Americano, mismo que ha sido combatido en las últimas tres décadas principalmente con el uso de plaguicidas de amplio espectro, ocasionando así el desarrollo de resistencia a la mayoría de los productos químicos registrados (García & Tarango, 2009).

### **4.2.1. Otras plagas de menor incidencia**

A pesar de ser *S. frugiperda* la plaga más problemática, también existen otros insectos que causan daños y pérdidas al cultivo, entre algunos de los principales se encuentran los gusanos saltarines (*Elasmopapus lignosellus* Zeller), gusano de la semilla (*Hylemia* sp), trips (*Frankliniella williamsi* Hood), gallina ciega (*Phillophaga* sp), gusano de la raíz (*Diabrotica virgifera zea*), colaspis (*Colaspis* sp), gusano

elotero (*Helicoverpa zea* Boddie) y pulgones del cogollo (*Rhopalosiphum maidis* Fitch), entre otros (Marín, 2001).

### **4.3. Control de plagas**

Actualmente el principal método para controlar las plagas a nivel mundial es el control químico, sin embargo tiene efectos colaterales hacia el medio ambiente y la salud humana (Ortiz *et al.*, 2014; Radhakrishnan & Shanmugam, 2017).

Bolognesi (2003) señala que la aplicación de agroquímicos es el medio más eficaz y aceptado para la protección de las plantas contra las plagas. Asimismo asegura que el uso de estos productos ha contribuido significativamente a la productividad agrícola mejorada y rendimiento de los cultivos. No obstante su estudio muestra que los plaguicidas químicos son potencialmente mutágenos ya que pueden inducir alteraciones cromosómicas o daño en el ADN, a lo cual se le conoce como genotoxicidad. Misma que se presenta en personas que están expuestas por largos periodos de tiempo a dichos agroquímicos, como son los agricultores, los aplicadores de plaguicidas y los trabajadores de las fábricas que manipulan los productos que vienen del campo. Además está demostrado que muchos de los compuestos químicos como lo son los plaguicidas perduran en el medio ambiente, lo cual expone a todas las personas de manera inevitable a dichos residuos, asimismo la población está expuesta de manera directa al consumir agua y alimentos con residuos de dichos productos.

Por otro lado, los motivos antes mencionados obligan a la sociedad a buscar nuevas alternativas de consumo, por lo cual ha ido creciendo la importancia comercial de la

agricultura ecológica, ya que existe una demanda creciente de productos naturales, no tóxicos y biodegradables (Bolognesi, 2003).

#### **4.3.1. Control de *Spodoptera frugiperda* en el mundo con enemigos naturales**

Actualmente *S. frugiperda* es controlada por plaguicidas principalmente aunque en los últimos años el control biológico se ha incrementado, siendo los parasitoides el principal enemigo natural para combatirla. Uno de los países que ha aportado avances en cuanto al combate de este insecto es Colombia, donde se probó la longevidad y la tasa de parasitismo de tres especies de parasitoides del género *Trichogramma* (*Trichogramma atopovirilia* Oatamar & Platner, *Trichogramma exiguum* Pinto & Platner y *Trichogramma pretiosum* Riley) para el combate de *S. frugiperda*. Encontrando en los resultados que *Trichogramma pretiosum* podría ser un parasitoide muy promisorio para el control de *S. frugiperda* (Díaz *et al.*, 2012). No obstante existen otros enemigos naturales que también tienen un gran potencial en la protección de cultivos. Actualmente se han hecho intentos para utilizar nematodos en el control de plagas debido a la alta efectividad y especificidad que tienen contra las plagas objetivo (Soler *et al.*, 2003).

Sin duda alguna estos antecedentes motivaron a Kaya *et al.* (2006) a afirmar que en muchos países del mundo ha ido creciendo el interés por la investigación en torno a los nematodos entomopatógenos.

A medida que más científicos se involucran en el trabajo con estos enemigos naturales, la cantidad de información publicada aumentará de forma concomitante. Asimismo menciona que la situación en la mayoría de los países de América Latina muestra un interés emergente en dicho ámbito y en efecto, existen estudios que se

han enfocado en las técnicas de aplicación de los nematodos entomopatógenos *H. indica* y *Steinernema* sp para controlar *S. frugiperda* en el maíz, siendo (García *et al.*, 2008) quien experimentó en la fase V<sub>6</sub> de maíz rociando las plantas con un máximo de 288 millones de juveniles infectivos de *Steinernema* sp por ha, encontrando en sus resultados que no se observó mortalidad significativa, lo cual atribuye a la falta de agua, misma que afectó la movilidad del nematodo cuando estaba en busca del huésped. Motivo por el cual hace hincapié en realizar estudios adicionales en la tecnología de aplicación de los nematodos entomopatógenos para el control de *S. frugiperda*.

En otro estudio realizado en Brasil se probó la eficacia de nematodos entomopatógenos asociados a una mezcla de insecticidas para controlar *S. frugiperda* en cultivos de maíz ya que al igual que en México es una de las plagas más destructivas en dicho país, encontrando en los resultados del estudio que las cepas *H. indica*, *S. carpocapsae* y *S. glasiari*, junto con 18 insecticidas para el control de *S. frugiperda* en maíz no lograron la mortalidad esperada por lo cual sugirieron evaluar diferentes concentraciones y realizar nuevos estudios para determinar las concentraciones óptimas (Negrisoli *et al.*, 2010).

#### **4.3.2. Control de *Spodoptera frugiperda* en México**

En México se ha estudiado bastante en torno al control biológico aplicado al cultivo del maíz, encontrando que *S. frugiperda* puede ser combatida de manera efectiva mediante el uso de parasitoides.

En 2013 se evaluó el parasitismo natural sobre larvas de gusano cogollero en 10 comunidades del estado de Michoacán, durante el ciclo primavera-verano de los años 2011 y 2012, encontrando ejemplares de parasitoides de las familias: Braconidae, *Chelonus insularis*, *Chelonus sonorensis*, *Meteorus* sp y *Cotesia* sp; Ichneumonidae, *Campoletis sonorensis* y *Pristomerus spinator* (Becerra *et al.*, 2013). Sin embargo en el campo de los nematodos entomopatógenos aún no hay suficientes estudios que permitan consolidar e identificar cepas altamente efectivas para *S. frugiperda*. No obstante algunos estudios han demostrado la resistencia *S. frugiperda* a los insecticidas lambdacialotrina, deltametrina, ciflutrina y metomil (León-García *et al.*, 2012). Motivo por el cual es necesario evaluar opciones de control para este insecto plaga y una de ellas sería recurrir a las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae ya que tienen un futuro prometedor en el control de plagas en cultivos anuales, así como también es pertinente el uso de estos microorganismos en la agricultura moderna y sostenible para mejorar la salud de los cultivos, optimizar los rendimientos y proteger el medio ambiente frente a los contaminantes y alteraciones al que está expuesto.(Campos-Herrera *et al.*, 2015).

#### **4.4. Biología de *Spodoptera frugiperda***

*S. frugiperda* tiene un ciclo biológico que pasa por huevecillo, larva, pupa y adulto, una vez que alcanza su madurez se convierte en una palomilla de color café grisáceo de aproximadamente de 2 a 3 cm de longitud (Cuadro 1 y 2). Al iniciar su ciclo dicha palomilla coloca masas de huevos de color blanco, son puestos en grupo y están acompañados por secreciones bucales de la palomilla. Asimismo una

hembra puede poner de 100 a 200 huevos por ovipostura y hasta 1, 500 en su vida fértil (Capinera, 1999).

Cuadro 1. Duración del ciclo biológico de *Spodoptera frugiperda*.

<b>Días Promedio</b>			
<b>Huevo</b> 2-5	<b>Larva</b> 17-32	<b>Pupa</b> 6-13	<b>Adulto</b> 6-20

Cuadro 2. Número de días que permanece en cada estadio

<b>Días por estadio</b>			
<b>Estadio 3</b> 2	<b>Estadio 4</b> 4	<b>Estadio 5</b> 2	<b>Estadio 6</b> 4

Al igual que otros insectos la pupa de esta especie se desarrolla en el suelo y es de color claro (García & Tarango, 2009).

#### **4.4.1. Hábitos**

El adulto o palomilla es de hábito nocturno, es por esto que difícilmente podemos percatarnos de su presencia durante el día, ya que permanece escondida entre el follaje o el suelo, asimismo su color favorece para confundirse en este último; a esta característica se le conoce como mimetismo. Una vez que las palomillas opositan después de cuatro a cinco días ocurre la emergencia de las pequeñas larvas, las cuales se alimentan juntas en un principio y poco después se dispersan, algunas penetran al cogollo, otras invaden plantas vecinas para alimentarse de las hojas en crecimiento. Cabe destacar que durante las primeras fases de desarrollo del cultivo

(de 4 a 6 hojas) las masas de huevos de *S. frugiperda* son más abundantes en la parte baja de la planta de maíz y en el envés de la hoja (García & Tarango, 2009).

La larva de este insecto pasa por seis estadios en un lapso de tres semanas y cuando alcanzan su madurez larval se pasan al suelo para iniciar su estado de pupa, al cabo de una semana emerge un adulto (Capinera, 1999).

#### **4.4.2. Daños**

A partir del tercer estadio la alimentación de las larvas en el cogollo se manifiesta con una hilera de perforaciones en las hojas. Los últimos estadios pueden ocasionar una defoliación completa, dejando únicamente nervaduras o tallo de plantas (Capinera, 1999). Por otro lado el daño económico de esta plaga generalmente es importante ya que una infestación no controlada de *S. frugiperda* puede ocasionar una reducción del rendimiento hasta de un 60% debido a la pérdida del área foliar y a un retraso o inhibición en la emisión de las inflorescencias (García & Tarango, 2009). Asimismo es importante señalar que las plantas de maíz son susceptibles a ser dañadas por el gusano cogollero durante su desarrollo vegetativo, de la emergencia hasta los 55-60 días después de dicha fase por lo tanto en esta etapa es cuando se deben aplicar medidas de control.

#### **4.5. Antecedentes del control biológico**

Desde tiempos pasados el uso de enemigos naturales para el control de plagas ha sido utilizado; uno de los casos más antiguos se remonta al menos 800 años y hace referencia al uso de hormigas por agricultores chinos (Del Bosque & Bernal, 2007). De acuerdo a Debach (1964), los chinos colocaban nidos de una hormiga

depredadora en arboles de naranja y mandarina con la finalidad de reducir el número de insectos que se alimentaban del follaje, además los productores ayudaban a las hormigas a trasladarse de un árbol a otro poniendo puentes de bambú. Por otro lado en Yemen los productores de dátiles cada año bajaban de las montañas colonias de especies benéficas de hormigas y las colocaban en las palmas para controlar los insectos dañinos.

Un antecedente histórico del control biológico es un caso sumamente exitoso que se presentó en California en el año 1887. Donde la industria citrícola estaba amenazada con la destrucción debido a una infestación masiva de la escama algodonosa, misma que estaba obligando a los agricultores a abandonar el cultivo de cítricos. No obstante los agricultores fueron apoyados por parte del gobierno y parte de las acciones fue enviar a Australia un entomólogo para que buscara enemigos naturales y los llevara a California, lo cual funciono de manera exitosa introduciendo a la *Rodolia cardinalis*, mejor conocida como vedalia (Debach, 1964). En las últimas tres décadas el desarrollo del control biológico ha surgido principalmente por la necesidad de encontrar una alternativa a los plaguicidas que se emplean en el control químico, mismos que son de alta toxicidad tanto para los productores como para los consumidores, además de ser de altamente persistentes. En contraste una solución podría ser la implementación de un manejo integrado de plagas, en el cual entra en acción el control biológico (Fischbein, 2012). Motivo por el cual es importante el conocimiento de la entomofauna regional nativa e introducida de cada región ya que permite diseñar programas de manejo biológico de plagas, implementar estrategias de manejo de bajo impacto a la fauna benéfica

y establecer estrategias de respeto a las cadenas tróficas (Gutierrez-Ramírez *et al.*, 2013).

Por otro lado Gaugler & Kaya (2000), afirman que el control de insectos moderno está cambiando de la utilización de insecticidas orgánicos sintéticos a favor de un enfoque de manejo integrado de plagas (MIP), asimismo hacen hincapié en que es una táctica que está en constante movimiento hacia la agricultura “sustentable”. El control biológico juega un papel sustancial en el MIP; siendo los nematodos entomopatógenos bienvenidos a una amplia gama de enemigos naturales, lo cual aporta nuevas herramientas que deben ayudar a mejorar la habilidad de integrar varias medidas de manejo de esas plagas.

Por todo lo anterior mencionado hay una inminente necesidad de detener los daños ocasionados al medio ambiente y prevenir enfermedades en los seres vivos, lo cual puede lograrse con agentes de control biológico (Gaugler & Kaya, 2000).

#### **4.5.1. Historia del control biológico en México.**

El primer caso exitoso de control biológico fue cuando se combatió a la mosca negra de los cítricos (*Aleurocanthus woglumi* Ashby), en el estado de Sinaloa en 1935.

Esta mosquita se extendió rápidamente en las zonas citrícolas del país, ocasionando enormes pérdidas y a raíz de esta situación se elaboró un proyecto entre el Departamento Mexicano de Agricultura y la USDA (Departamento de Agricultura de EE. UU.), dicho proyecto implicó la introducción y liberación de la *Encarsia perplexa* Huang y Polaszek. Sin lugar a duda la alianza entre México y EUA fue exitosa. Esa experiencia proporcionó un claro ejemplo del valor de la

búsqueda de agentes de control biológico en las regiones que son climáticamente similares a las del país que está buscando a los enemigos para el control biológico (Williams *et al.*, 2013).

A pesar de ser un caso exitoso no fue hasta 1942 cuando el control biológico de insectos despertó realmente el interés de los especialistas en México, ya que se realizaron trabajos de mayor relevancia con la introducción de *Aphelinus mali* Haldeman para el control del pulgón lanígero del manzano *Eriosoma lanigerum* Hausmann en Coahuila (Del Bosque & Bernal, 2007).

En tiempos más recientes, se tiene registro de plagas que han sido controladas biológicamente, como son: la broca del café *Hypothenemus hampei* Ferrari a finales de la década de los ochentas por medio del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* Blas y el parasitoide *Cephalonomia stephanoderis* Betrem (Badii *et al.*, 2000), las moscas de la fruta *Anastrepha* sp, ha sido controlada por medio de liberaciones aumentativas de parasitoides (Montoya & Cancino, 2004).

Asimismo Williams *et al.* (2013) mencionan que México ha sido identificado como el punto de origen de varias especies perniciosas, en particular la conchuela del frijol (*Epilachna varivestis* Mulsant), el picudo del algodónero (*Anthonomus grandis* Boh) y la mosca mexicana de la fruta mosca (*Anastrepha ludens* Loew), entre otras. Por otro lado es importante mencionar que recientemente han entrado plagas que no se tenían, como por ejemplo la polilla guatemalteca de la papa (*Tecia solanivora* Povolny) en Chiapas; trips del melón (*Thrips palmi* Karny) establecidos en los estados de Chiapas, Campeche, Yucatán, y Quintana Roo; y ácaro rojo de las palmeras (*Raoiella indica* Hirst), una plaga de las palmeras y plátano, que invadió

Yucatán. Cabe mencionar que el peligro está latente ya que existen amenazas de plagas en las fronteras como el escarabajo del laurel rojo (*Xyleborus glabratus* Eichhoff), actualmente presente en Florida y Alabama, y los vectores de un hongo patógeno que podría dañar la industria del aguacate de México. También la palomilla del nopal (*Cactoblastis cactorum* Berg), la polilla fue introducida en una serie de islas del Caribe a partir de 1957, se detectó en la Florida en 1989 y ahora se está extendiendo a través del sureste de Estados Unidos con graves consecuencias para *Opuntia* local (Williams *et al.*, 2013).

#### **4.5.2. Definiendo el control biológico**

El control biológico es definido como “la acción de parasitoides, depredadores o patógenos para mantener la densidad de población de un organismo plaga a una menor densidad, lo cual no ocurriría en su ausencia”. Lo cual se puede sintetizar como el uso de organismos vivos que reducen la disponibilidad, calidad o valor de algunos recursos del hombre, estos recursos pueden ser plantas de algún ecosistema en particular o cultivos destinados a consumo humano (Hajek, 2004).

Sin embargo los métodos químicos han sido los más empleados alrededor del mundo, lo cual no significa que sean una buena alternativa, esto debido a que dichos productos están asociados a efectos negativos como la resurgencia de la plaga al cabo de determinado tiempo. Asimismo los brotes de plagas secundarias como consecuencia de la mortandad de los enemigos naturales que la controlaban y/o la adquisición de una resistencia al plaguicida por parte de la plaga. Es así que el uso del control biológico, al no dejar residuos químicos y al actuar de manera más

específica y permanente sobre la población problema es una gran alternativa (Fischbein, 2012).

#### **4.5.3. Métodos de control biológico**

Así como podemos encontrar diferentes tipos de plagas, con diferentes características y en distintos ecosistemas, también existen diversos métodos de control que se ajustan a cada circunstancia. Mismos que por lo general, se diferencian por el tipo de enemigo natural a emplear, por cómo éste es liberado o manipulado o bien por el resultado obtenido a inmediato o a largo plazo. Existen tres categorías principales de control biológico.

#### **4.5.4. Control biológico clásico**

Este tipo de control se caracteriza por la introducción de un enemigo natural en un nuevo ambiente, dicho en otras palabras esto ocurre cuando un insecto que ataca cultivos se introduce de un país a otro, en la nueva región éste suele convertirse en plaga de los cultivos. Esto sucede porque en el nuevo sitio no tiene sus enemigos naturales que regulen sus poblaciones, por lo cual a este tipo de insecto plaga se le conoce como plaga exótica. Para la regulación de plagas exóticas los especialistas del control biológico desarrollaron la técnica denominada introducción de enemigos naturales o control biológico clásico, el cual consiste en la regulación de la población de una plaga mediante enemigos naturales exóticos (parásitos, depredadores o patógenos), que se importan con este fin. Habitualmente, la plaga clave la constituye una especie exótica que ha alcanzado una alta densidad poblacional en el nuevo

ambiente, por condiciones más favorables que en su lugar de origen (Nicholls, 2008).

#### **4.5.5. Control biológico por aumento**

En este tipo de control se requiere una propagación masiva y la liberación periódica de enemigos naturales exóticos o nativos, los cuales se multiplican durante la estación de crecimiento del cultivo; sin embargo, no se espera que se conviertan en parte permanente del ecosistema, simplemente se está actuando de manera emergente. Dicha liberación puede realizarse con expectativas de corto o largo plazo, lo cual depende de la especie plaga que se busca tratar, las especies de enemigos naturales y el cultivo. El incremento consiste en la manipulación directa de enemigos naturales para aumentar su efectividad. Esto se logra mediante uno o ambos de dos métodos generales: producción masiva y colonización periódica, o mejoramiento genético de los enemigos naturales. De estos dos conceptos el de uso más común es el primero, en él los enemigos naturales se producen en insectarios y luego se liberan ya sea de manera inoculativa o inundativa. Por ejemplo, en áreas donde un enemigo natural particular no puede invernar, una liberación inoculativa cada primavera permite que la población se establezca y controle la plaga de manera adecuada. Mientras que las liberaciones inundativas involucran la liberación de grandes números de enemigos naturales de tal modo que su población domine por completo la plaga. El incremento se usa donde las poblaciones de enemigos naturales no están presentes o no responden con suficiente rapidez al aumento de la población de plagas (Nicholls, 2008).

#### **4.5.6. Control biológico por conservación**

En general este tipo de control biológico busca implementar varias medidas para proteger, aumentar la abundancia y mejorar las actividades de los enemigos naturales ya presentes en una área determinada (Fischbein, 2012).

Por otro lado este enfoque enfatiza en el manejo de agroecosistemas, tiene el objetivo de proveer un ambiente general conducente a la conservación y crecimiento de una biota compleja de enemigos naturales. Las posibilidades de incrementar poblaciones efectivas de artrópodos benéficos son viables por medio del manejo del hábitat, que a su vez media la disponibilidad de alimentos, refugio y otros recursos para los enemigos naturales dentro y fuera del cultivo. Por lo cual se puede concluir que es proveer al enemigo natural de alimento, refugio y presas u hospederos alternativos para conservarlo aún cuando no haya algún cultivo establecido (Nicholls, 2008).

En muchos casos, con la implementación de una sola de estas estrategias no se logra controlar eficazmente una plaga y por lo tanto, resulta conveniente poner simultáneamente en práctica más de un método de control. Las diferentes estrategias de control biológico, no sólo no son excluyentes sino que además pueden combinarse con otras tácticas de control, dentro de un plan de manejo integrado de plagas.

#### **4.6. Controladores biológicos**

*S. frugiperda* es una plaga con un gran número de enemigos naturales, los cuales pueden ser parasitoides, depredadores o entomopatógenos (Cuadro 3). Motivo por

el cual es importante cuantificar el efecto de los insectos benéficos nativos, conservar y fomentar su actividad mediante la implementación del control biológico (García & Tarango, 2009).

Cuadro 3. Especies benéficas y de entomopatógenos más comunes que atacan a *Spodoptera frugiperda* (García & Tarango, 2009).

Parasitoides	Depredadores	Entomopatógenos
<i>Telenomus</i> sp.	<i>Zelus</i> sp	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>T. pretiosum</i>	<i>Orius tristicolor</i>	<i>Virus de la poliedrosis nuclear</i>
<i>T. exiguum</i>	<i>Cycloneda sanguínea</i>	<i>Nomuraea rileyi</i>
<i>Chelonus insularis</i>	<i>Hyppodamia convergens</i>	<i>Steinernema carpocapsae</i>
<i>Meteorus laphygamae</i>	<i>Coleomegilla maculata</i>	
<i>Apanteles</i> sp	<i>Podisus</i> sp	
<i>Winthemia</i> sp		
<i>Sacophaga</i> sp		
<i>Archytas marmoratus</i>		

#### 4.6.1. Control biológico de plagas mediante nematodos entomopatógenos

Cuando se piensa en control biológico, generalmente se asocia con parasitoides y depredadores, ya que han sido los más empleados. Sin embargo los nematodos entomopatógenos representan una gran opción, siendo estos agentes prometedores para el control biológico de plagas de insectos que viven en el suelo y en diversos cultivos (Campos-Herrera *et al.*, 2012). Asimismo en la última década han surgido nuevos estudios que permiten conocer su amplia distribución y su

efectividad contra diversas plagas agrícolas (Erbaş *et al.*, 2014; Rodríguez *et al.*, 2013). La distribución de NEPs a escala global es muy diversa y variante. Estudios recientes muestran que el cambio climático y la actividad antropogénica han afectado estas poblaciones de microorganismos, así como su distribución; No obstante, existen cepas resistentes a diversas temperaturas, lo cual con las condiciones climáticas actuales es de suma importancia para identificar cepas que puedan incorporarse al control biológico de plagas de determinadas áreas geográficas.

Cabe destacar que en la actualidad los nematodos entomopatógenos se producen comercialmente para aplicarlos por inundación y se hace la liberación de infectivos juveniles (IJs), sobre todo en suelos. Sin embargo, varios estudios examinan el potencial de estos NEPs de suelo en aplicaciones foliares (Schroer & Ehlers, 2005; Beck *et al.*, 2013; Brusselman *et al.*, 2012b; Laznik *et al.*, 2012; Noosidum *et al.*, 2016; Radhakrishnan & Shanmugam, 2017).

Por otro lado si se toma en cuenta el fracaso de los plaguicidas o los desastres ecológicos que ocasionan dichos productos, como por ejemplo los residuos venenosos que existen en la comida, la contaminación del agua, pérdida de biodiversidad, entre otras. Encontramos que la implementación de estos enemigos naturales puede ser una alternativa para el control de *S. frugiperda*. Ya que constantemente se evalúa la viabilidad de una suspensión de nematodos en diferentes soluciones adyuvantes o adherentes que permitan la transferencia de NEPs desde el tanque de aplicación (pulverización convencional) hasta el follaje, siendo el objetivo principal adherir los NEPs a dicha superficie, lo cual se puede

lograr mediante la incorporación de adyuvantes, ya que reducen el escurrimiento de las hojas (Schroer & Ehlers, 2005); motivo por el cual se busca incorporar diferentes adherentes que permitan la fijación de estos microorganismos al follaje y pueda formularse una suspensión que forme una película que proteja al nematodo y lo ayude a sobrevivir más tiempo.

Aunado a estos factores, son de suma importancia los avances que se han tenido en el campo del uso de nematodos entomopatógenos para el control de plagas, siendo significativos los resultados que se obtuvieron en el control del gusano de la manzana (*Cydia pomonella* L.) mediante el uso del nematodo entomopatógeno *S. feltiae*, encontrando que la HR es un factor determinante para el desempeño de los mismos. Asimismo los resultados arrojaron que los nematodos tienen que ser aplicados en contra de las larvas en la etapa más susceptible (según la biología de la plaga); también se encontró que estos microorganismos se desempeñan de manera exitosa cuando la aplicación es realizada por la tarde, ya que a medida que las temperaturas descienden durante la noche y la humedad aumenta, resulta más favorable para llevar a cabo el desplazamiento (Navaneethan *et al.*, 2010).

Alrededor del mundo se ha probado la efectividad de los nematodos entomopatógenos en control de insectos plaga, tal es el caso de Costa Rica donde se utilizó al nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis atacamensis* en el control del picudo del banano (Amador *et al.*, 2015).

En el contexto nacional la aplicación de nematodos nativos de Oaxaca, fue un gran avance ya que se emplearon para combatir larvas de tercer estadio de picudo negro de *Agave* sp, donde se encontró que los nematodos nativos presentaron un

excelente control, solo necesitaron ocho días para eliminar el 100% de larvas (Bolaños *et al.*, 2006).

Un estudio realizado por Ruíz & Bolaños (2003) demostró la efectividad de *S. glaseri* aplicada en solución acuosa para combatir larvas de gallina ciega *Phyllophaga vetula* en cultivos de maíz.

#### **4.6.2. Nematodos entomopatógenos**

La mayoría de los organismos son susceptibles a una variedad de enfermedades agudas y fatales causadas por patógenos, los cuales pueden ser importantes en el corto plazo como reguladores de las poblaciones de insectos. Se incluyen bacterias, virus, hongos, nematodos y protozoarios, mismos que son los causantes de epizootias en las poblaciones naturales (Nicholls, 2008).

Los nematodos son organismos no segmentados, cilíndricos o elongados con forma de anguila y presentan cuerpos lisos. Tienen un sistema excretor, nervios, aparato digestivo y reproductivo, pero no tienen sistema circulatorio o respiratorio. El tracto alimenticio consiste de una boca seguida por la cavidad bucal o estoma, esófago, intestino, recto y ano. Aunado a lo anterior, pueden llegar a vivir en una diversidad de hábitats como el suelo, agua salada y agua dulce. Cabe mencionar que algunos de ellos viven libremente mientras que otros son parásitos en plantas y animales. Los nematodos entomopatógenos son un importante grupo de enemigos naturales capaces de causar la muerte, debilitamiento y/o esterilización de una gran cantidad de insectos, tanto terrestres como acuáticos. Algunos de los más usados son los de las Steinernematidae y Heterorhabditidae (Carballo *et al.*, 2004).

#### **4.6.3. Ciclo de vida**

Los Steinernematidos poseen un ciclo de vida simple que incluye el huevo, cuatro estadios juveniles separados por mudas y los adultos. El nematodo se desarrolla dentro del hospedero hasta estado juvenil antes de emerger. Cada estado subsiguiente se alimenta y muda hasta el próximo estado, esto es de juvenil a J3 y luego a J4 y finalmente al estado adulto. El estado infectivo del nematodo entomopatógeno es el J3 y es referido como infectivo juvenil (IJ). Este estado está adaptado para sobrevivir largos periodos de tiempo en el suelo, es decir que los nematodos son muy resistentes a las condiciones ambientales, por sus características fisiológicas y morfológicas. Tanto los IJs machos como las hembras son capaces de infectar al hospedero.

Los nematodos copulan y producen la progenie en el hemocele y bajo condiciones favorables, los juveniles infectivos de la segunda generación abandonan el cadáver en busca de nuevos hospedantes. Los nematodos pueden estar dentro de un insecto por 2-3 generaciones y luego, emerger como juveniles infectivos. A temperatura ambiental, esto puede ocurrir entre 7 a 10 días desde la infestación hasta la emergencia de los juveniles (Cano *et al.*, 2004).

#### **4.6.4. Modo de entrada**

Una vez que el nematodo ha encontrado su hospedante apropiado, el infectivo juvenil entra al hospedante a través de las aberturas naturales (boca, ano y espiráculos) y menos comúnmente penetra a través de la pared intestinal o la

tráquea hasta alcanzar el hemocele. En adición, también poseen una terminal dentada que puede ser usada para penetrar áreas suaves (Gaugler & Kaya, 2000).

#### **4.6.5. Comportamiento de búsqueda**

Algunos nematodos presentan un comportamiento de “emboscada”. Cuando estos nematodos están en el suelo permanecen inmóviles hasta que detectan la proximidad de un posible hospedador y es entonces cuando se activa el comportamiento de búsqueda que les permite abalanzarse sobre el insecto que parasitaran. Por el contrario, otros nematodos presentan un comportamiento de “navegante”. Estos nematodos cuando están en el suelo están continuamente desplazándose, buscando un posible insecto que les sirva de hospedado (Miret, 2005).

#### **4.6.6. Modo de acción**

Una vez que el nematodo entra en el hemocele del insecto, este libera la bacteria *Xenorhabdus* o *Photorhabdus luminescens*, la cual empieza a multiplicarse y causar septicemia que mata al hospedero, cabe mencionar que la bacteria la consume y digieren los nematodos (Nicholls, 2008).

#### **4.6.7. Sintomatología**

De acuerdo a Nicholls (2008) la mayoría de nematodos castran, debilitan o matan a su hospedero. Además de reducir la longevidad, de la actividad de vuelo, del desarrollo retardado y otros cambios de conducta, tanto fisiológicos como morfológicos.

#### **4.6.8. Aplicación foliar**

El uso de nematodos para controlar insectos del follaje es problemático debido a la desecación rápida y el efecto letal de la luz ultravioleta (Nicholls, 2008). La aplicación muy de mañana o en la tarde aumenta la efectividad. En condiciones de follaje denso o cuando las plagas objetivo son de hábitos escondidos como enrolladores de hoja o minadores, se incrementa el desempeño de los nematodos comparado con superficies muy expuestas, además de influir de manera determinante la disolución de los mismos (Miret, 2005).



## **5.2. Obtención y reproducción de material biológico (nematodos entomopatógenos y larvas de *Spodoptera frugiperda*).**

### **5.2.1. Reproducción de nematodos entomopatógenos**

Para la reproducción de los organismos biológicos se trabajó en condiciones controladas con una humedad relativa máxima de  $56 \pm 8.36$  y una mínima de  $45 \pm 8.68$  % y una temperatura máxima de  $23 \pm 2.16$  y una mínima de  $21 \pm 2^\circ$  C en el laboratorio de Entomología del CIIDIR Oaxaca IPN. Se realizó el cultivo de los nematodos entomopatógenos de las cepas a evaluar (*H. bacteriophora*, *S. carpocapsae*, *S. colombiense* y *S. westeri*). Como hospedero se utilizaron larvas de último instar de la polilla de la cera *Galleria mellonella* (Linnaeus). Siguiendo el método propuesto por Kaya & Stock (1997).

### 5.2.2. Cámaras húmedas

A los tres días después de la inoculación, los hospederos infectados (*G. mellonella*) fueron colocados en cajas petri con discos de papel filtro en su interior (diámetro de 90 mm, Whatman No. 44) sobre los cuales se colocaron los cadáveres y fueron revisados diariamente para inspeccionar la emergencia de nematodos entomopatógenos (Figura 2 y 3), una vez que aparecieron fueron colectados en agua bidestilada en contenedores de 250 mL.

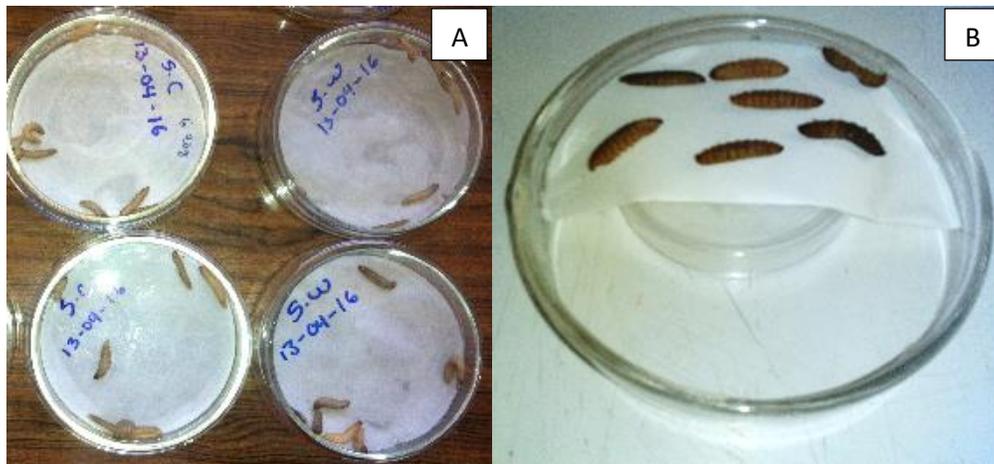


Figura 2. A) Inoculación de NEPs en larvas de *G. mellonella*. B) Muerte y reproducción de nematodos entomopatógenos en cámaras húmedas en larvas de *G. mellonella*.

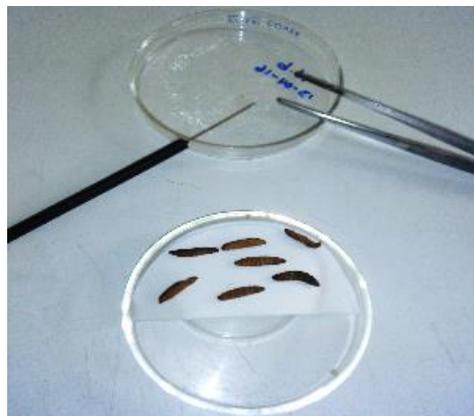


Figura 3. Monitoreo de emergencia de IJs

### 5.2.3. Recolección de larvas de *Spodoptera frugiperda* en plantas de maíz

En campo, en el cultivo de maíz se realizaron colectas de larvas de *S. frugiperda* (cuarto instar), la longitud media que presentaron fue de 2.3 cm (Figura 4), las larvas se depositaron en botes transparentes de 50 mL de capacidad y en su interior se depositaron hojas de maíz que sirvieron de alimento.



Figura 4. Longitud media de larvas de cuarto instar.

### 5.3. Obtención y evaluación de adherentes con características de viscosidad e hidratación.

Para esta determinación se evaluaron plantas y aceites con características glutinosas y líquidas (Cuadro 4). La variable a determinar fue la permanencia a través del tiempo de cada adherente. Al material vegetativo que se empleó, se le realizó una extracción de sabia por medio de un raspado en hojas Pitahaya (*Hylocereus undatus*), Sábila (*Aloe vera*) y Nopal (*Opuntia* sp); se tomaron 13.5 g, a cada muestra y se les incorporó 20 mL de agua destilada y se licuaron para obtener una mezcla homogénea (Figura 5).

Los aceites empleados fueron Aceite de oliva (*Olea europaea*), Aceite de coco (*Cocos nucifera*) y los jabones utilizados fueron Alquil Sulfato de Sodio, Triclosán, Antibencil (Cloruro de Benzalconia) estos tampoco se licuaron. Además de un testigo, para este experimento se trabajaron 6 repeticiones por tratamiento. Y se tomaron 240 µL de cada solución, de los cuales se obtuvieron 6 gotas de 40 µL en las que se determinó por medio observación y de una placa cuadrículada la reducción del área de la gota. Asimismo se contabilizó el tiempo de permanencia y/o fijación de cada solución a la superficie, ambas observaciones y toma de datos fueron cada 8 h durante 7 días.

Cuadro 4. Evaluación de adherentes con características de viscosidad e hidratación

No.	Tratamiento
1	<i>Hylocereus undatus</i> (Pitahaya)
2	<i>Aloe vera</i> (Sábila)
3	<i>Opuntia</i> sp (Nopal)
4	Alquil Sulfato de Sodio (Detergente)
5	Triclosán (Detergente)
6	Cloruro de Benzalconio (Antibencil)
7	<i>Olea europaea</i> (Aceite de oliva)
8	<i>Cocos nucifera</i> (Aceite de coco)
9	Testigo (Agua)

Para determinar la efectividad de tratamientos, se realizó un análisis de varianza y se establecieron las diferencias entre las medias a través de la prueba de Tukey con el empleo del programa estadístico SAS (2012) Statistical Analysis System.

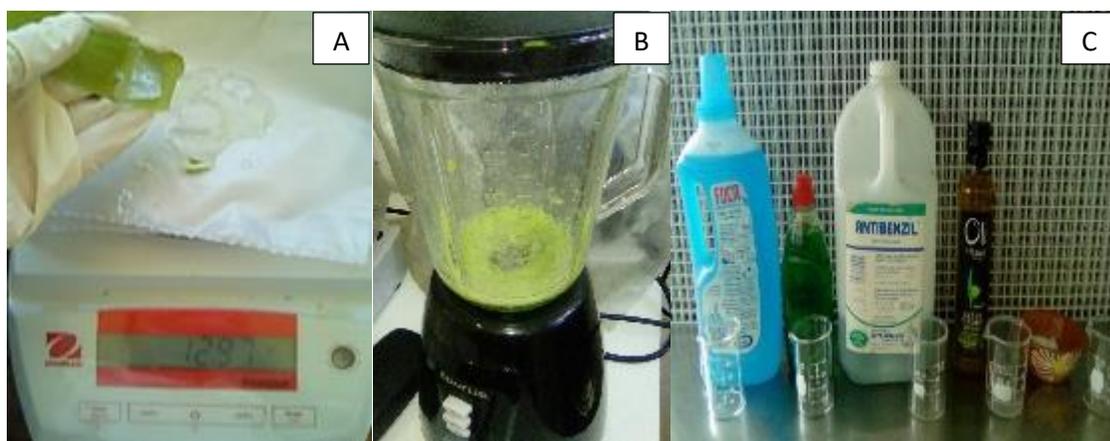


Figura 5. A) Raspado para la extracción de sabia. B) Molienda de sabia para homogenización de la mezcla. C) Obtención de adherentes en condiciones de laboratorio.

### 5.3.1 Tiempo de desecación de adherentes en condiciones de laboratorio

Para esta determinación se utilizó una micropipeta de 100-1000  $\mu\text{L}$  de capacidad, se tomaron 240  $\mu\text{L}$  de adherentes y se colocaron gotas de 40  $\mu\text{L}$  en portaobjetos y estos a su vez sobre servitoallas humedecidas (Figura 6).

Para este ensayo se trabajó con 9 tratamientos y 6 repeticiones. Las observaciones se realizaron cada 8 horas durante el tiempo que duró el adherente, registrando la medida inicial y final de cada adherente. En esta determinación la metodología empleada fue colocar una placa cuadrículada bajo el portaobjetos cada 8 h para determinar por medio de observación la reducción del área de las gotas correspondientes a cada tratamiento, además de llevar el registro del tiempo de

permanencia y/o fijación de cada tratamiento a la superficie, ambas observaciones concluyeron al finalizar el experimento (a los 7 días), esta fase experimental fue completamente cualitativa.

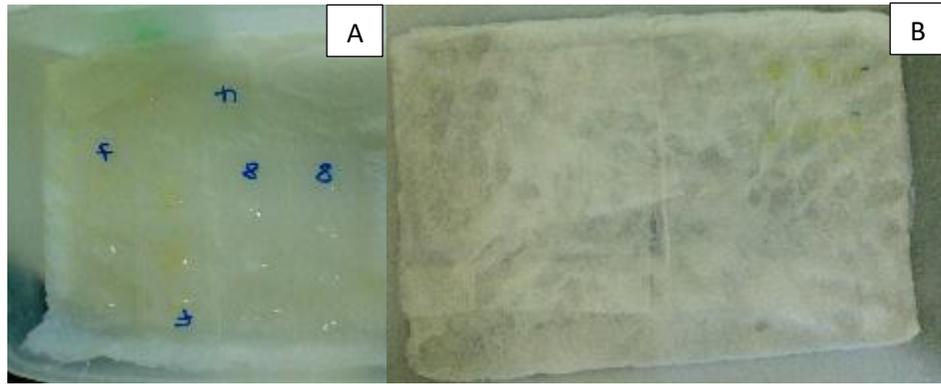


Figura 6. A) Portaobjetos con adherentes sobre servitoallas humedecidas. B) Portaobjetos con adherentes sobre servitoallas humedecidas al tercer día.

Para determinar la efectividad de tratamientos, se realizó un análisis de varianza y se establecieron las diferencias entre las medias a través de la prueba de Tukey con el empleo del programa estadístico SAS (2012) Statistical Analysis System.

#### **5.4. Sobrevivencia de nematodos entomopatógenos en diferentes adherentes**

Se evaluó la sobrevivencia de los nematodos entomopatógenos *S. colombiense* y *S. carpocapsae* mezclados con adherentes. Con una micropipeta de 100-1000  $\mu\text{L}$  de capacidad se tomaron 240  $\mu\text{L}$  de cada adherente Pytahaya (*H. undatus*), Aceite de oliva (*Olea europaea*) y Aceite de coco (*Cocos nucifera*) y se mezclaron con 240  $\mu\text{L}$  de agua con  $451 \pm 10$  nematodos respectivamente, por tratamiento se pusieron  $50 \pm 5$  nematodos de las especies evaluadas, las mezclas se colocaron en portaobjetos y se siguió la metodología antes señalada en el apéndice 5.3. Las

observaciones se realizaron cada ocho horas durante el tiempo que duró el adherente (Figura 7). Para esta determinación se trabajó con seis tratamientos y ocho repeticiones (Cuadro 5).

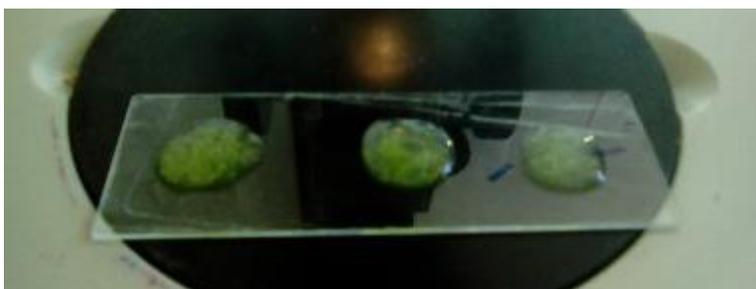


Figura 7. Conteo de nematodos en adherentes

Para determinar la efectividad de tratamientos, se realizó un análisis de varianza y se establecieron las diferencias entre las medias a través de la prueba de Tukey con el empleo del programa estadístico SAS (2012) Statistical Analysis System.

Cuadro 5. Evaluación de sobrevivencia de dos cepas de nematodos entomopatógenos en laboratorio en adherentes.

No.	Tratamiento	Nematodo
1	<i>Hylocereus undatus</i> (Pitahaya)	<i>S. colombiense</i>
2	<i>Hylocereus undatus</i> (Pitahaya)	<i>S. carpocapsae</i>
3	<i>Olea europaea</i> (Aceite de oliva)	<i>S. colombiense</i>
4	<i>Olea europaea</i> (Aceite de oliva)	<i>S. carpocapsae</i>
5	<i>Cocos nucifera</i> (Aceite de coco)	<i>S. colombiense</i>
6	<i>Cocos nucifera</i> (Aceite de coco)	<i>S. carpocapsae</i>

### 5.5. Efectividad de nematodos entomopatógenos + adherentes sobre larvas de *Spodoptera frugiperda* en condiciones de laboratorio

En condiciones de laboratorio se evaluaron dos adherentes aceite de oliva (*Olea europaea*) y aceite de coco (*Cocos nucifera*). La dosis de inoculación fue de 200  $\mu$ L, la cual se conformó de una relación 1:1 (50% de aceite y 50% agua con NEPs). Se emplearon cuatro cepas de nematodos entomopatógenos a tres diferentes concentraciones, 200, 400, 600 nem/larva con seis repeticiones por tratamiento. Los nematodos a evaluar fueron *H. bacteriophora*, *S. carpocapsae*, *S. colombiense* y *S. westeri*, un testigo (blanco) y un químico (Clorpirifos etil a una concentración de 0.75-1.0 L/ha). Siendo un total de 26 tratamientos evaluados (Cuadro 6).

Cuadro 6. Evaluación de nematodos entomopatógenos en larvas de *Spodoptera frugiperda* en condiciones de laboratorio.

#### Tratamientos

Nematodo	Adherente	Adherente	Concentración
<i>H. bacteriophora</i>			
<i>S. carpocapsae</i>			
<i>S. colombiense</i>	Aceite de oliva	Aceite de coco	200, 400 y 600
<i>S. westeri</i>			
Testigo			
Clorpirifos etil			2.5 mL

En botes de plástico de 50 mL de capacidad se colocaron larvas cuarto instar de *S. frugiperda* con hojas de maíz (Figura 8), las larvas se dejan 48 h en observación, se procedió a inocular de forma dirigida el alimento de las larvas con las

concentraciones antes mencionadas y de esta forma se determinó la patogenicidad de los nematodos entomopatógenos en larvas.

Las observaciones se realizaron cada ocho horas, el experimento concluyó hasta obtener el 100 % de mortandad en larvas.



Figura 8. Alimentación de larvas de *S. frugiperda* antes de la inoculación

Las larvas muertas se colocaron en cámaras húmedas para determinar el efecto real de la mortalidad. A estos insectos se les diseccionó para verificar la existencia de los agentes entomopatógenos en su interior, además de realizar los postulados de Koch que consisten en tomar una muestra del contenido estomacal de la larva muerta, aislarlo, purificarlo e inocularlo en larvas sanas para finalmente re aislar el agente entomopatógeno. Dichos postulados de acuerdo a adecuaciones hechas por Lacey (2012) son los siguientes:

1. El patógeno debe ser aislado de los insectos enfermos examinados y los signos o síntomas de la enfermedad registrada deberán estar ausentes en los sanos.
2. El patógeno debe crecer en cultivo puro o en un insecto susceptible y debe ser identificado y/o caracterizado.

3. El patógeno debe ser inoculado en insectos saludables de la misma especie o una relacionada con la original, los signos y síntomas de la enfermedad deben ser los mismos.
4. El patógeno debe aislarse nuevamente en cultivo puro o en un insecto susceptible, y sus características deben ser exactamente iguales a las observadas inicialmente.

Por otro lado se determinó la  $DL_{50}$  y la  $DL_{90}$  mediante un análisis de Probit (SAS) del bioensayo de laboratorio.

Para determinar la mortalidad de larvas de *S. frugiperda*, se realizó un análisis de varianza y se establecieron las diferencias entre las medias a través de la prueba de Tukey con el empleo del programa estadístico SAS (2012) Statistical Analysis System.

#### **5.6. Efectividad de la $DL_{90}$ de nematodos entomopatógenos + adherentes en plantas de maíz.**

Para este experimento se evaluaron las  $DL_{90}$  de dos nematodos entomopatógenos, un tratamiento con Clorpirifos etil y un testigo (Cuadro 7). Con una jeringa de 10 mL de capacidad se aplicaron las cepas de nematodos entomopatógenos en forma dirigida, en el cogollo en planta de maíz en etapa vegetativa V6 – V8. La variable evaluada fue el número de larvas muertas. Para este experimento se trabajó con 21 repeticiones por tratamiento, los muestreos se realizaron cada 48 h. La duración del

trabajo fue de 14 días. En cada toma de datos se cortaron 3 plantas por tratamiento, en periodos de 48 h, para esta determinación se obtuvieron 7 colectas.

Cuadro 7. Tratamientos aplicados en campo.

No.	Tratamiento	DL 90
1	<i>H. bacteriophora</i> + aceite de oliva	
2	<i>H. bacteriophora</i> + aceite de coco	
3	<i>S. westeri</i> + aceite de oliva	200 ± 15 nematodos / planta
4	<i>S. westeri</i> + aceite de coco	
5	Químico / Clorpirifos etil	2.5 mL / planta
6	Testigo	---

### 5.6.1. Distribución experimental

La parcela donde se llevó a cabo el experimento se encuentra ubicada en San Lorenzo Cacaotepec, Oaxaca. Se realizó del 20 de agosto al 2 de septiembre del 2016. El cultivo de maíz en el cual se llevó a cabo el experimento tenía 8 semanas de edad, encontrándose en etapa vegetativa V6-V8.

La distribución fue completamente al azar, se aplicaron a plantas de tres surcos y se dejaron dos surcos (70 cm de separación entre surcos) de maíz como separación entre tratamientos, las plantas de maíz se marcaron con listones de diferentes colores, ubicadas como tratamientos. Como unidad experimental se tomó a una planta de maíz.

Para la evaluación de los tratamientos, se destruyó por completo la planta de maíz hasta llegar al cogollo para registrar el número de larvas muertas o vivas de *S.*

*frugiperda*. Las larvas encontradas se colocaron en botes de 50 mL y se trasladaron a laboratorio, las larvas vivas se les dejó terminan su ciclo biológico y con larvas muertas fueron colocadas en cámaras húmedas para realizarles la necropsia y corroborar por la emergencia de nematodos del cadáver de la larva que la mortalidad fue debida a los tratamientos aplicados (Figura 9).



Figura 9. Traslado de larvas vivas y muertas a laboratorio

### 5.6.2. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos de mortalidad se realizaron las pruebas de Bartlett y la de Shapiro-Wilk, para determinar si presentaban homogeneidad de varianzas y normalidad, encontrándose que no cumplían ninguna de estas condiciones. Se aplicaron diversas transformaciones para lograr que los datos cumplieran estas condiciones; sin embargo con ninguna de ellas se pudo lograr.

Se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para determinar si existía diferencia estadística entre tratamientos y en caso afirmativo hacer la comparación de medias.

### 5.7. Evaluación de la vida de anaquel de la suspensión de nematodos *S. colombiense* + adherentes.

Para la evaluación de viabilidad en una suspensión acuosa más adherentes se llevó a cabo un experimento donde se evaluó la efectividad del nematodo *S. colombiense* en aceite de coco (*Cocos nucifera*), aceite de oliva (*Olea europaea*) y agua, probando su infectividad en larvas de *G. mellonella* a 1, 3, 7, 14 y 28 días en almacenamiento a frentes temperaturas (4, 8,14, 20 y 24°C), cada tratamiento tuvo ocho repeticiones.

En placas multiwell se colocaron 100  $\mu$ L de las suspensiones de nematodos (20 IJs) en cada pocillo, en combinación con cada uno de los adherentes ya mencionados y se almacenaron a diferentes temperaturas por tiempos determinados imagen (Figura 10).

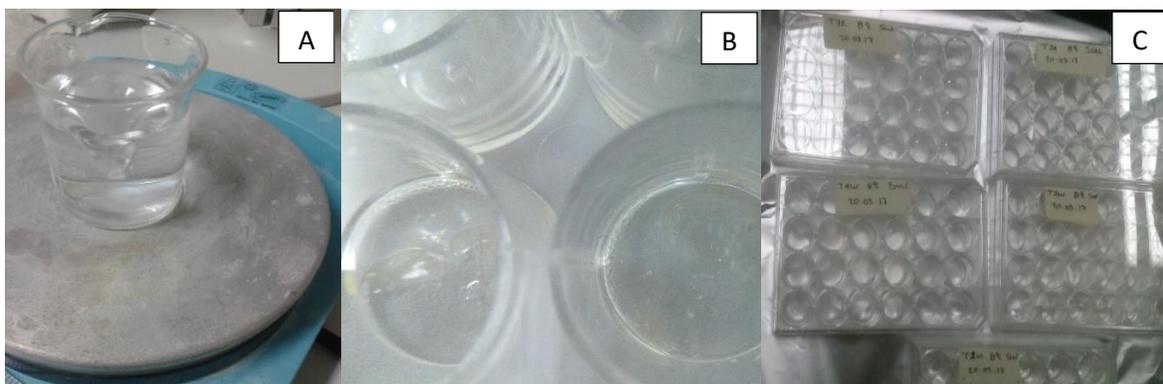


Figura 10. A) Preparación de suspensión B) Colocación de IJs C) Almacenamiento de suspensión de nematodos + adherentes a diferentes temperaturas en placas multiwell.

Posteriormente al cumplir el periodo de tiempo establecido (1, 3, 7, 14 y 28) días, se procedió a sacar las placas de cada una de las temperaturas (4, 8, 14, 20 y 24

°C) y se realizó un recuento de nematodos vivos, posteriormente se colocaron 2 g de arena estéril y una larva *G. mellonella* de quinto instar para evaluar la mortalidad a cuatro días (Figura 11).

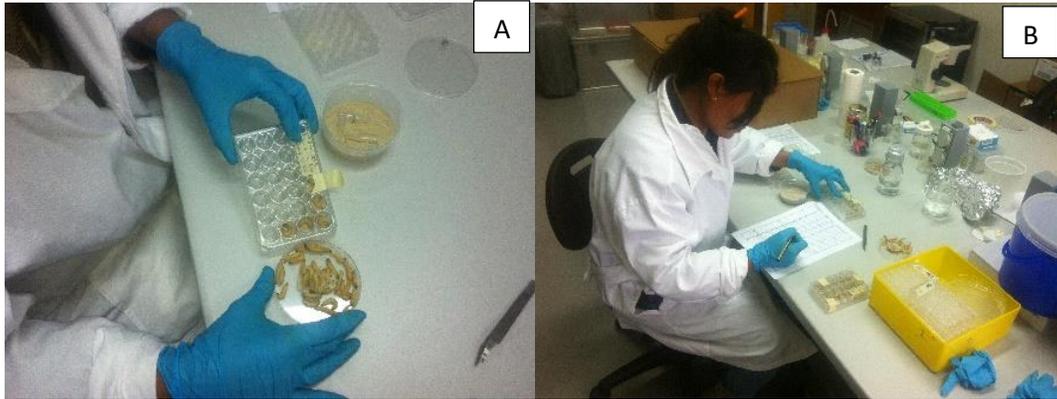


Figura 11. A) Colocación de larvas *G. mellonella* para evaluar la efectividad de los nematodos entomopatógenos B) Registro del tiempo de mortalidad en larvas.

### 5.7.1. Análisis estadístico

Para determinar la efectividad de los nematodos almacenados se evaluó la mortalidad de larvas de *G. mellonella*, se realizó un análisis de varianza y se establecieron las diferencias entre tratamientos con el empleo del programa estadístico SAS (2012) Statistical Analysis System.

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 6.1. Obtención y evaluación de adherentes con características de viscosidad e hidratación

Los adherentes evaluados presentaron persistencia desigual en el tiempo. Y se encontró que existe una variación que va de 1 a 7 días según las características de cada uno de los adherentes evaluados. Mediante el análisis de varianza se comprobó que existen diferencias estadísticas entre tratamientos (Figura 12). Se encontró una duración media de 7 días para los tratamientos con aceite de oliva y coco, tratamientos estadísticamente diferentes al resto, el segundo mejor tratamiento fue (Alquil sulfato de sodio y el tratamiento *H. undatus*) que presentaron una permanencia de 4 días, mientras que *A. vera*, *Opuntia* sp tuvieron una duración media menor. La aplicación de triclosán y cloruro de benzalconio mostraron el mismo efecto que si se hubiese aplicado con el método convencional que es con agua.

Estudios realizados anteriormente demuestran que el efecto de la incorporación de antidesecantes en suspensiones acuosas de nematodos o formulaciones de aceites ofrecen posibilidades para incrementar la eficacia contra insectos defoliadores (Glazeer, 1992; Chueca *et al.*, 2009; Navaneethan *et al.*, 2010). Asimismo en la última década se ha incrementado la investigación en torno a la aplicación de nematodos entomopatógenos adicionando adherentes a la suspensión que permita fijar a los microorganismos en la parte foliar y aérea de la planta (Beck *et al.*, 2013). Por otro lado Navon *et al.* (2002) afirma que cualquier sistema práctico de manejo

de plagas de insectos basado en el uso de NEPs en las plantas requeriría la persistencia de los nematodos durante 24-96 h, tiempo suficiente para que las larvas adquieran una dosis letal de nematodos.

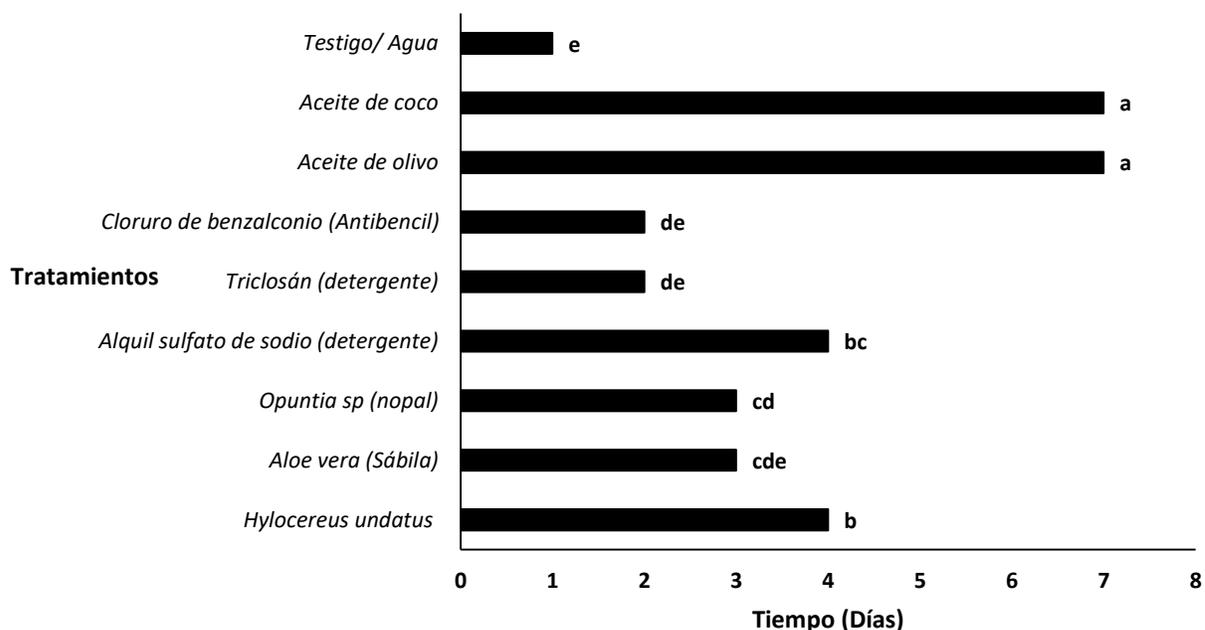


Figura 12. Permanencia de adherentes en días. Diferentes letras en columnas indican diferencias significativas (Tukey,  $p \leq 0.05\%$ ).

Por otro lado Restrepo & Aristizábal (2010) obtuvieron como resultado que la adición de cera de carnaúba y mucílago de *Aloe vera* demuestra un efecto favorable frente a la pérdida de humedad en frutos a los 7 y 10 días. Asimismo Shapiro-Ilan (2010) observó un 70-100% de efectividad en el control de *Synanthedon pictipes* con la incorporación del gel Barricade® a soluciones acuosas con *Steinernema sp.*

## 6.2. Supervivencia de los nematodos *S.carpocapsae* y *S. colombiense* en tres adherentes.

Se encontró estadísticamente que 6 tratamientos, mostraron diferencias en la cantidad de nematodos sobrevivientes. Encontrando que a las 48 h todos los tratamientos mostraron presencia de nematodos vivos. El tratamiento con mayor porcentaje de supervivencia fue el 3 (AO+SC), registró 32% de supervivencia y estadísticamente este tratamiento fue diferente a todos los demás. Con respecto a las 96 h se encontraron 2 tratamientos AC+SC y AO+SC con una presencia del 11 y 9% NEPs vivos/tratamiento respectivamente. Mientras que a las 144 h nuevamente los tratamientos AC+SC y AO+SC, registraron porcentajes de 10 y 8% (Figura 13 y 14). Se puede señalar que los resultados de supervivencia del nematodo *S.carpocapsae* se deben principalmente a la densidad de los aceites y la capacidad del nematodo para vivir en el a las 48, 96 y 144 h, comparado con el nematodo *S. colombiense*, que solo a las 48 h presentó supervivencia del 13%.

Con respecto a la supervivencia Naranjo *et al.* (2012) señala que a las 24 h después de la infección (ddi) encontró un porcentaje de mortalidad del 75% en ninfas de *Collaria senica* Stal inoculadas con *Steinernema* sp, y 82% a las 48 h en las inoculadas con *Heterorhabditis* sp. Lo cual indica en estudios la efectividad de *Steinernema* sp. Dichos resultados sugieren que la efectividad pueda deberse a una resistencia y supervivencia mayor de *S. carpocapsae* como lo muestra este estudio.

En este contexto los resultados obtenidos por Dito *et al.* (2016) confirman la efectividad del uso de geles e ingredientes anti UV (radiación ultravioleta) o con propiedades antidesecantes en la aplicación de NEPs ya que tienen un gran

potencial para el manejo de plagas aéreas. Lo cual concluyeron al evaluar las tasas de sobrevivencia en de *Steinernema carpocapsae* en ocho adyuvantes diferentes, los cuales fueron: gel (Barricade®), Nemaprotect (NemaP), Octil metoxicinamato (OMC), Soyscreen (Ss), Soyscreen+Fantesk (aceite: almidon, 1:1) (Ss-F), dióxido de titanio (TD), Waterlock, Yucca y control (agua sin NEPs).

Los resultados encontrados en los porcentajes de sobrevivencia se comportaron de la siguiente manera. Después de 30, 60 y 120 min en cada solución se encontró que la sobrevivencia de IJs en Barricade® Gel protector, TD, y OMC, no fueron significativamente diferentes del control en cualquiera de las exposiciones, manifestando una sobrevivencia entre el 85-95 %. Nemaprotect tuvo menor sobrevivencia (81-71%) que el control (95- 93%) a los 30 y 120 minutos. El tratamiento Soyscreen + Fantesk (aceite: almidón, la sobrevivencia fue menor (76%) que el control (94%) a los 60 minutos. Después de 120 minutos, la formulación de Soyscreen + Fantesk (aceite: almidón,) tenía una sobrevivencia significativamente menor de IJs (71%) que SoilMoist y Soyscreen.

Estos resultados mostraron la capacidad que tienen los NEPs para adaptarse a los diferentes adyuvantes, sin embargo un factor determinante para la sobrevivencia es el tiempo de exposición, si bien este estudio evaluó la sobrevivencia en intervalos de tiempo muy cortos, el comportamiento observado es claramente similar a nuestros resultados ya que en nuestro primer tiempo de interés (48h) hubo persistencia de nematodos vivos, registrándose un porcentaje de sobrevivencia del 32% para la cepa *S. carpocapsae*, cabe mencionar que al transcurrir las primeras 8 h la cantidad de NEPs vivos era la misma a la inicial, dicho patrón de

comportamiento se observó en el trabajo antes mencionado ya que las tasas de sobrevivencia fueron cercanas al 100% (80-95%) en todos los tratamientos evaluados. Sin duda alguna al estar los NEPs en contacto con los adyuvantes por un periodo de tiempo prolongado impacta la sobrevivencia, disminuyendo drásticamente a partir de las 48 h con 32% y 96 h 9% para nuestro caso de estudio, mismo fenómeno observado a los 120 min en el caso de la formulación de Soyscreen + Fantesk (aceite: almidón), la cual disminuyó de un 100% a un 71% en un lapso de 2 h.

De acuerdo con Glazer (2002) las tasas de sobrevivencia están estrechamente vinculadas al metabolismo de los NEPs, donde la temperatura es un factor determinante. A mayor temperatura la movilidad se incrementa y el gasto de lípidos también según lo observado en *Steinernema rarum* (OLI), lo cual provoca un desgaste y una baja en la sobrevivencia (Cagnolo & Campos, 2008).

Por otro lado Noosidum *et al.* (2016) evaluó la sobrevivencia de *S. carpocapsae* y *Steinernema sp.* En discos de hojas de col rizada. Las suspensiones de nematodos que se utilizaron se prepararon mezclándolos con agua del grifo o un tensioactivo (0.2% ó 0.4% APSA-80TM, 80% de tensioactivo no iónico, Amway (Tailandia) Co., Ltd.) o un gel retardante del fuego (0,25% o 0,5% de Barricade®, Barricade International, Inc. Hobe Sound FL) para evitar la desecación. Cada suspensión NEPs contenía 200 IJs / 250 µL, y se aplicó a un disco de hoja de col rizada con un pulverizador de plástico manual.

Posteriormente se evaluó el número de NEPs vivos en todos los tratamientos a los 60, 120 y 180 min posteriores a la pulverización. Encontrando como resultados que a los 60 min después la persistencia de IJs fue significativamente influenciada tanto

por las especies de NEPs y los anti-deseccantes, hubo una interacción significativa entre los dos factores, presentando tasas de supervivencia de *S. carpocapsae* + 0.25% y 0.5% de Barricade® (87% y 93%, respectivamente) fueron significativamente más altas que los NEPs + el agua del grifo, para 0.2% y 0.4% de APSA-80TM (37-55%, respectivamente). Todas las tasas de supervivencia de *Steinernema* sp. Superaron el 82%, excepto cuando se mezcló con APSA-80TM al 0.4% (54 %). Después de 120 min, la persistencia de IJs fue significativamente influenciada por los anti-deseccantes, mientras que tanto NEPs respondieron de la misma manera.

Para el caso de NEPs + 0.25% y 0.5% de Barricade® tuvieron tasas de supervivencia significativamente más altas (81- 93%) que otros tratamientos que, variaron de 44 - 64%, excepto *Steinernema* sp. Aislar K8 más agua del grifo (83%). Con respecto a los 180 min después, las tasas de supervivencia las tasas de supervivencia de NEPs +0.25% y 0.5% Barricade® fueron significativamente más altas con otros tratamientos 80-85%, mientras que las tasas de supervivencia en los otros tratamientos fueron <70,1%. Dichos resultados confirman que la incorporación de antidesecantes aumenta la supervivencia de los NEPs.

De acuerdo a los resultados obtenidos por Bolaños *et al.* (2016) al evaluar el efecto de los NEPs *H. bacteriophora*, *S. carpocapsae*, *S. feltiae* y *S. westeri* a tres concentraciones (200, 400 y 600 nematodos/larva) en larvas de tercer instar del gusano de la fruta (*Heliothis subflexa*), se destaca el desempeño de *S. carpocapsae* a concentraciones de 200 y 600 nem/larva respectivamente, el cual obtuvo una mortalidad del 80 y 100%, respectivamente después de 24 h haber sido inoculadas. Asimismo el nematodo *S. westeri* bajo la misma concentración presentó en el mismo

periodo de tiempo una efectividad del 70% y 100%, respectivamente, observando así que son los steinernematidos tienen ventaja sobre los heterorabditidos.

En otro estudio Santhi *et al.* (2015) evaluó los movimientos que realizan en *S. carpocapsae* y *H. bacteriophora* para la localización de larvas del picudo rojo de la palma (*Rhynchophorus ferrugineus*). Encontrando que *S. carpocapsae* tuvo movimientos ascendentes más prominentes que *H. bacteriophora*. Aunque en general *H. bacteriophora* se clasifica como navegante y *S. carpocapsae* como emboscador, sin embargo en dicho estudio se descubrió que *S. carpocapsae* se comporta como navegante y emboscador lo cual le permite dispersarse mucho más rápido hacia las larvas de *R. ferrugineus* en contraste con *H. bacteriophora*, lo cual da lugar a que pueda existir una ventaja de los steinernematidos sobre los heterorabditidos.

En este contexto se ha demostrado que los NEPs a altas concentraciones junto con componentes abióticos favorables (humedad y temperatura óptima) pueden ser muy eficaces agentes de control biológico de insectos en la agricultura comercial (Laznik *et al.*, 2012).

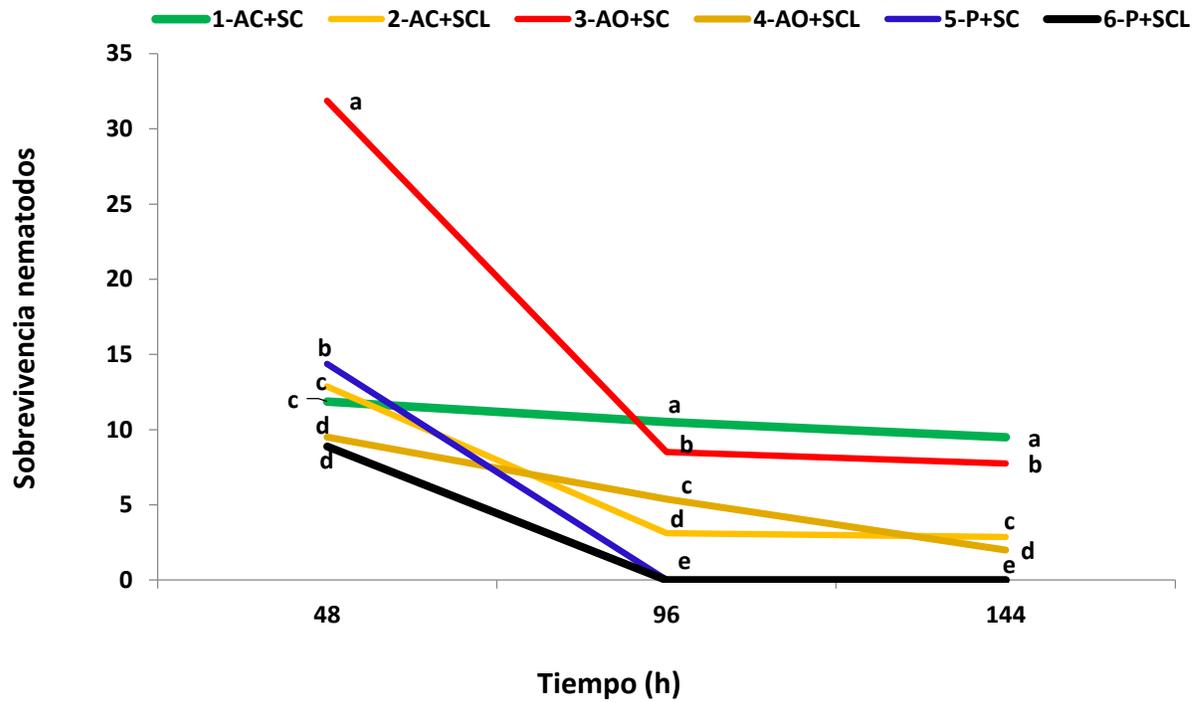


Figura 13. Sobrevivencia de dos cepas de nematodos entomopatógenos en tres adherentes. Diferentes letras en líneas indican diferencias significativas (Tukey,  $p \leq 0.05\%$ ).

\*1AC+SC (Aceite de coco + *S. carpocapsae*), 2AC+SCL (Aceite de coco + *S. colombiense*), 3AO+SC (Aceite de oliva + *S. carpocapsae*), 4AO+SCL (Aceite de oliva + *S. colombiense*), 5P+SC (Pitahaya + *S. carpocapsae*) y 6P+SCL (Pitahaya + *S. colombiense*).

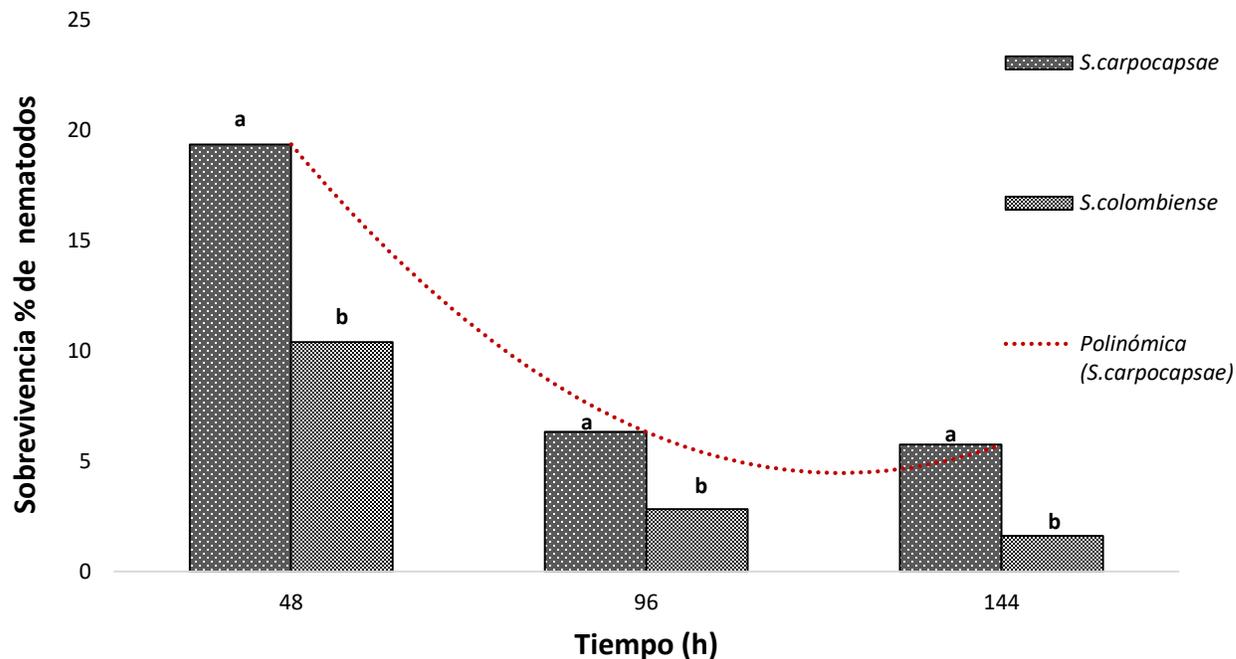


Figura 14. Sobrevivencia de dos nematodos entomopatógenos a diferentes tiempos en adherentes. Diferentes letras en columnas indican diferencias significativas (Tukey,  $p \leq 0.05\%$ ).

### 6.3. Efectividad en larvas de *Spodoptera frugiperda* con nematodos entomopatógenos + adherentes en condiciones de laboratorio

En condiciones de laboratorio se encontró que no hay diferencia significativa entre tratamientos a las 24, 48 y 72 h, por lo tanto concentraciones de 200 y 400 nem/larva son apropiadas para un control del 100% en larvas de *S. frugiperda* en condiciones de laboratorio (Figura 15). En contraste el uso del testigo, como forma convencional de aplicación de NEPs muestra la ausencia de mortalidad a las 24 y 48 h, lo cual es debido a la desecación del adherente, misma que afecta a los NEPs y limita la búsqueda del hospedero (*S. frugiperda*). Cabe destacar que los tratamientos que no obtuvieron la mortalidad del 100% a las 24 h, esta se completó a las 48 h.

Naavetan (2010) encontró que al inocular larvas de *C. pomonella* a concentraciones de 100 nem (*S. feltiae*)/larva, se obtiene un 60% de control en un periodo de 1 a 8 h bajo una HR de 60%- 80% a 15°C, lo cual es semejante a lo obtenido en este estudio, que registró el 67% de control a las 24 h en larvas de *S. frugiperda* para los tratamientos HB+Oliva y SCL+Oliva a una concentración de 200 nem/larva con una HR de 65% a 20°C. Lo anterior sugiere que la diferencia en el control obtenido se debe al tiempo de exposición de las larvas, concentración, temperatura y a la patogenicidad de las cepas utilizadas.

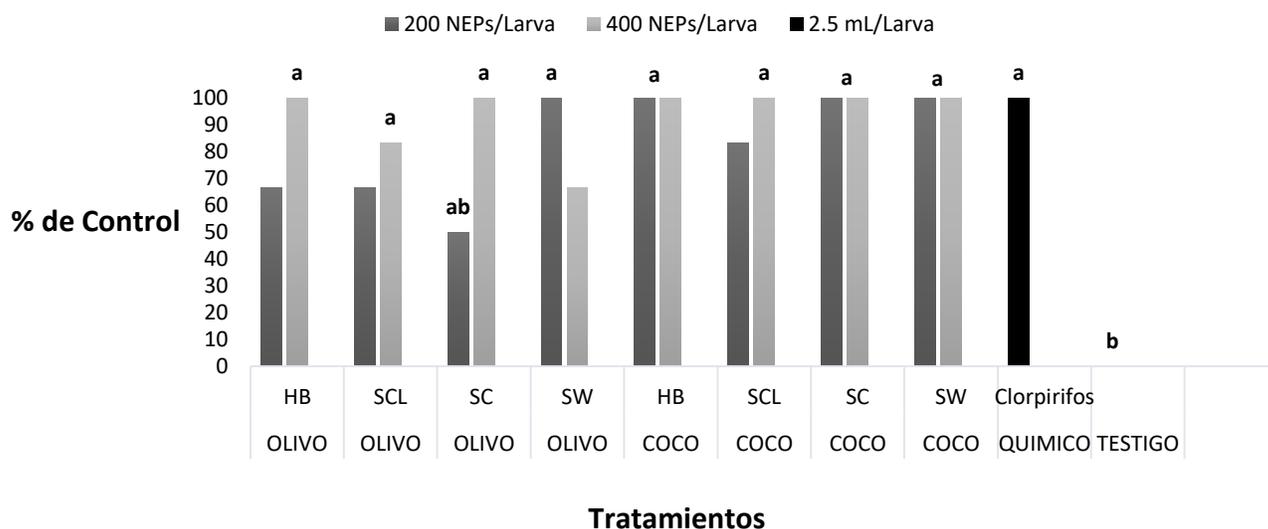


Figura 15. % de control encontrado en larvas de *S. frugiperda* en condiciones de laboratorio a las 24 h. Diferentes letras en barras indican diferencias significativas (Tukey,  $p \leq 0.05\%$ ). \* HB (*H. bacteriophora*), SCL (*S. colombiense*), S.C (*S. carpocapsae*), SW (*S. westeri*).

Por otro lado Amador (2015) señala que se puede obtener entre el 88-100% de control por infección de nematodos en un periodo de 72 h en condiciones de laboratorio al inocular larvas de picudo del banano (*Cosmopolites sordidus*) a

concentraciones de 100, 500 y 1000 nem (*Heterorabditis atacamensis*)/larva. La información generada en este estudio reafirma que es posible alcanzar un efectividad del 100%, ya que a concentraciones de 200 y 400 NEPs se logró controlar el total de larvas de *S. frugiperda* en un periodo de 48 h. Dichos resultados reafirman la información documentada por Campos-Herrera *et al.* (2015), quien afirma que los nematodos entomopatógenos pueden matar a los insectos hospedadores en menos de 48 h gracias a la acción concomitante de mutualista que tiene el infectivo juvenil con la bacteria. Asimismo se han investigado los efectos de las bacterias *Providencia vermicola* y *Flavobacterup* sp contra larvas de cuarto instar de *G. mellonella*, encontrando el 100% de mortalidad 48h después de la inoculación con el nematodo *Rhabditis blumi* (Nematoda: Rhabditida), tal cual sucedió en nuestro experimento (Figura 16) (Park *et al.*, 2011).

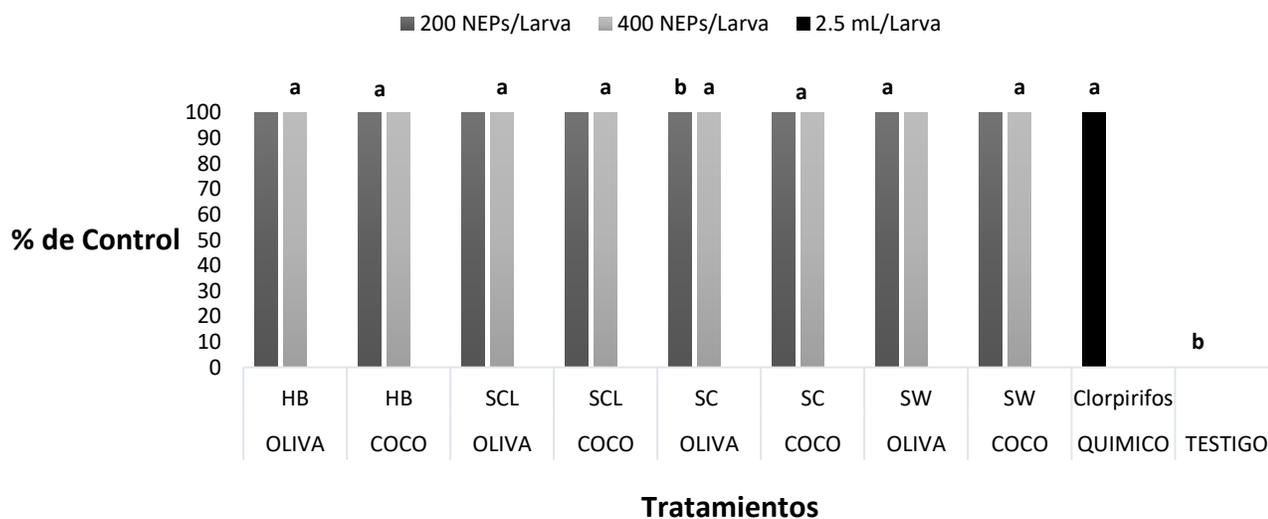


Figura 16. % de control encontrado en larvas de *S. frugiperda* en condiciones de laboratorio a las 48h. Diferentes letras en barras indican diferencias significativas (Tukey,  $p \leq 0.05\%$ ). \* HB (*H. bacteriophora*), SCL (*S. colombiense*), S.C (*S. carpocapsae*), SW (*S. westeri*).

En laboratorio, Caccia *et al.* (2014) estudió la eficacia del nematodo *Steinernema diaprepesi* contra larvas de *S. frugiperda* y *Helicoverpa gelotopoeon* a dos concentraciones; 50 y 100 nem/larva. En 48 h se empezó a observar mortalidad en los tratamientos. No obstante hasta el día 4 fue cuando se alcanzó un 93% de control con 50 nem/larva, mientras que la dosis más alta alcanzó el 100% mortalidad.

Con respecto a la mortalidad encontrada en *H. gelotopoeon* fue 87% (50 IJs) y 93% (100 IJs). Cabe destacar que en los tratamientos control no hubo mortalidad.

En contraste en nuestro estudio a dosis de 200 nem/larva registró un control superior al 50% en todos los tratamientos evaluados 24 h y alcanzó el 100% a las 48 h, mientras que en el caso de estudio abordado esos niveles de control se observaron hasta las 196 h.

#### **6.4. Evaluación de la DL<sub>90</sub> de nematodos entomopatógenos + adherentes en plantas de maíz.**

Al terminar la evaluación de la DL<sub>90</sub> en campo que duró 14 días, se encontró que el tratamiento 3 a base del nematodo *S. westeri* + aceite de oliva (3SW+AO) tuvo un control del 67 %, el tratamiento con Clorpirifos etil tuvo el 100 % de control contra larvas de cuarto instar de *S. frugiperda* desde las 24 h. Entre dichos tratamientos no se encontró diferencia estadística. Seguido a estos se encontró el tratamiento 4 (4SW+AC) con un 52% (Figura 17).

Con menos del 50 % de control se encontró a *H. bacteriophora* + aceite de oliva (1HB+AO) con un 43%, *H. bacteriophora* + aceite de coco (2HB+AC) con un control

del 38%. Estos tratamientos son estadísticamente diferentes al tratamiento con Clorpirifos etil y el tratamiento 3 (3SW+AO).

Delgado-Ochica & Sáenz (2012) encontraron que larvas de cuarto instar del picudo de la guayaba (*Conotrachelus psidii*) son susceptibles a la infección por nematodos en concentraciones de 500 nem/larva, obteniendo para *Heterorhabditis* sp un control del 85% seguida por *Steinernema* sp con un 78% y *S. colombiense* 55%. En contraste la información generada en el presente estudio sugiere que el tratamiento *S. westeri* + aceite de oliva (3SW+AO) a una concentración de 200 nem/larva tuvo un control del 67 %, lo cual indica que si se aumenta la dosis se pueden alcanzar resultados similares en un periodo de 24 a 48h. Aunado a los resultados Naranjo *et al.* (2012) afirma que *Steinernema* sp presenta mayor capacidad de patogenicidad, lo cual se comprobó en el presente estudio con *S. westeri*.

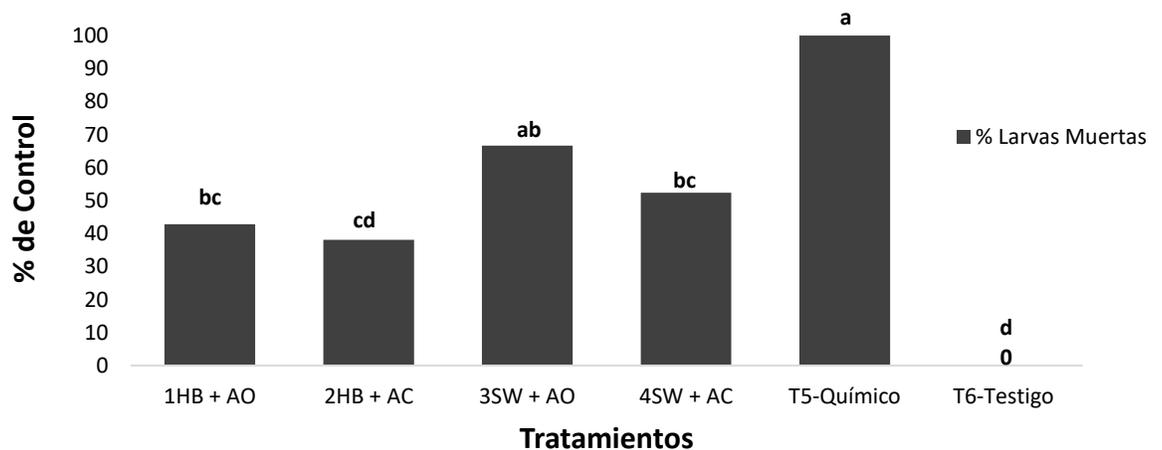


Figura 17. % de control de *S. frugiperda* encontrado en campo. Kruscal Wallis ( $p \leq 0.05\%$ ).  
 \*1HB+AO (*H. bacteriophora* + aceite de oliva), 2HB+AC (*H. bacteriophora* + aceite de coco),  
 3SW+AO (*S. westeri* + aceite de oliva), 4SW+AC (*S. westeri* + aceite de coco).

Asimismo los resultados obtenidos por Gözel & Kasap (2015) confirman la efectividad de los NEPs en condiciones de campo. Donde evaluaron cuatro cepas de NEPs contra larvas del minador del tomate (*Tuta absoluta*). Las cepas evaluadas fueron *Steinernema affine* (isolate 46), *S. carpocapsae* (isolate 1133), *S. feltiae* (isolate 879) y *Heterorhabditis bacteriophora* (isolate 1144). Las cuales mostraron un control durante dos años consecutivos (2012 y 2013), todas a una concentración de 50 IJs/cm<sup>2</sup>.

Las especies de nematodos más eficaces en larvas de *T. absoluta* fueron *S. feltiae* (cepa 879) con una mortalidad del 91% y 94% en 2012 y 2013, respectivamente. Mientras que la especie menos efectiva fue *S. affine* (aislamiento 46) con un 39% y 44% de mortalidad en 2012 y 2013 respectivamente.

Dichos resultados sugieren que los steinernematidos pueden ser candidatos potenciales para integrarse a un programa de manejo integrado de plagas; asimismo el 67% y el 52% de control encontrado en los tratamientos SW+AO y SW+AC respectivamente mostró en nuestro estudio que la superficie foliar de cada cultivo tiene una forma diferente, lo cual puede ser un factor determinante a la hora de medir mortalidad. Gözel & Kasap (2015) obtuvo mortalidades cercanas al 100%. Sin embargo la superficie foliar del tomate facilita el desplazamiento de lo NEPs. Mientras que en esta evaluación la aplicación fue en el cogollo del maíz, lo cual influye en el desplazamiento de los NEPs y de manera paralela el tiempo de infección.

En resumen el autor sugiere que los NEPs tienen un gran potencial para ser usados como agentes de control biológico para *T. absoluta*, destacando que al inocular los NEPs en el las hojas de tomate, los nematodos también se desplazaran por los túneles que la larva hace en el fruto, siendo este un excelente ambiente para penetrar en la plaga fácilmente, además de que permite a los NEPs evadir los factores negativos como la desecación y los rayos UV (Batalla-Carrera *et al.*, 2010). Dicha conclusión sugiere que un medio vegetal provee condiciones que favorecen el desempeño de los NEPs (Van Damme *et al.*, 2016).

En relación al presente caso de estudio, cabe destacar que donde no se obtuvo mortalidad en larvas de *S. frugiperda*, se llevaron a condiciones de laboratorio y se les dejó terminar su ciclo biológico (Figura 18). Con respecto a las larvas muertas por el efecto de los tratamientos biológicos fueron llevadas al laboratorio y se colocaron en cámaras húmedas para determinar el efecto real de su mortalidad. Sin embargo la emergencia de NEPs no fue la esperada, lo cual se debe a las concentraciones que se utilizaron, ya que Saavedra *et al.* (2010) afirman que a concentraciones de 250 nem/larva de cuarto instar no emergen nematodos del cuerpo de *S. frugiperda*, mientras que a concentraciones de 500 nem/ larva si emergen, lo cual explica la ausencia de nuevas generaciones a concentraciones de 200 nem/larva.

Lo mismo ocurre con larvas de quinto instar donde existe emergencia a concentraciones de 250 y 500 nem/larva.

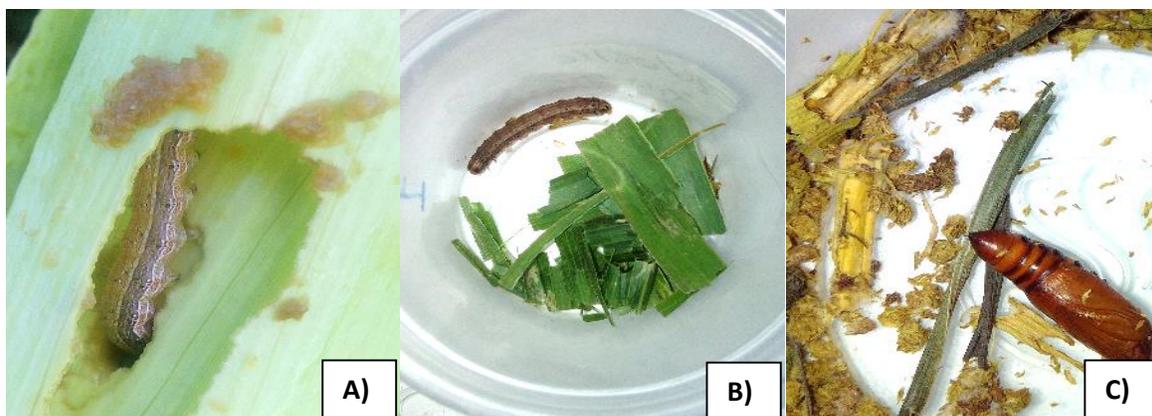


Figura 18. A) Larvas encontradas vivas B) Traslado de larvas a laboratorio y seguimiento de su ciclo biológico C) El seguimiento finalizó cuando las larvas se convirtieron en pupas y emergieron adultos de *S. frugiperda*.

En otros intentos por identificar adyuvantes que puedan proporcionar protección a NEPs a cuando se aplica directamente al sol, Dito *et al.* (2016) comprobaron si el gel (Barricade®) podría proporcionar a NEPs protección cuando se exponían al sol, así como también determinar si otros ingredientes agregados al gel aumentaban la eficacia, la retención de humedad y la supervivencia de NEPs al ser aplicados en alguna superficie foliar. Al evaluar *S. carpocapsae* en gel de protección al 1% causó mayor mortalidad (60%) que otros tratamientos (2-37%). Con respecto a la protección UV proporcionada por dióxido de titanio (TD) y Octil metoxicinamato (OMC) con una solución de gel de protección al 1% se probó al aire libre, lo cual presentó una mayor mortalidad en larvas (43 y 25%) que otros tratamientos (2-7%). Después de 8 horas en el invernadero, la solución de gel de protección al 0.25%

tenía el más alto porcentaje de NEPs vivos en hojas. Resultados similares se observaron en nuestro estudio ya que al cabo de 48 h de haber aplicado los tratamientos en campo se registró mortalidad, lo cual confirma los resultados de tener presencia de NEPs después de 8 h. Dichos resultados sugieren que la adición de adyuvantes protege a los NEPs y retarda su desecación, ampliando así el periodo de infectividad, lo cual es benéfico en aplicaciones en campo.

### 6.5. Evaluación de la vida de anaquel de la suspensión de nematodos *S. colombiense* + adherentes.

En los tratamientos evaluados se encontró que a medida que transcurren los días de almacenamiento de la suspensión de *S. colombiense* a distintas temperaturas tiene un efecto sobre la efectividad de los IJs. Después de sacar cada muestra de los refrigeradores se encontraron diferencias significativas ( $p=0.000$ ) entre la mortalidad que causaron los nematodos entomopatógenos a larvas de *G. mellonella*, así como también en el tiempo (días) en el que lograron matar a la larva (Figura 19 y 20), variando de 1 a 4 días.

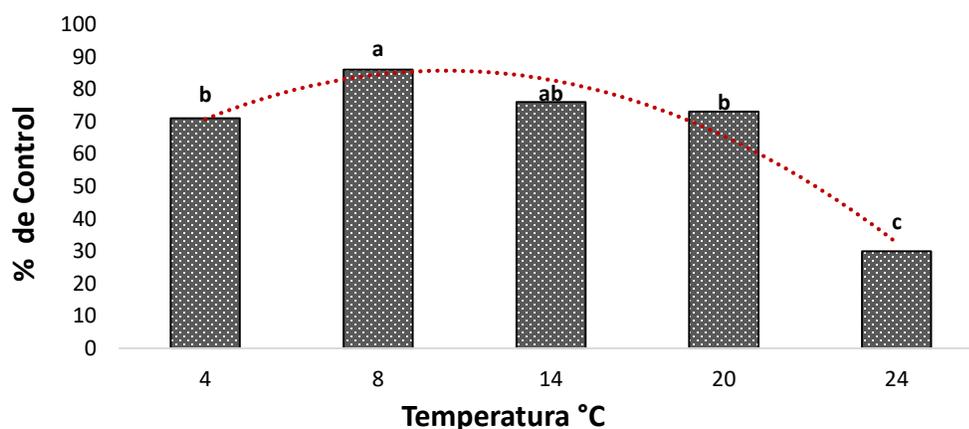


Figura 19. % de control encontrado en larvas de *G. mellonella* al almacenar la suspensión de *S. colombiense* a diferentes temperaturas.

El estudio realizado por Cagnolo & Campos (2008) también evaluó el efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la sobrevivencia y la infectividad de *Steinernema rarum* (cepa OLI) a  $23\pm 2$  °C y a  $5\pm 1$ °C, ya que las cepas de los NEPs de la familia steinernematidae difieren en su capacidad de infectar a los insectos a diferentes temperaturas. En dicho estudio los NEPs se almacenaron en cajas de plástico de 20 mL rellenos con 2 g de polieer poliuretano. Las cajas se mantuvieron en dos grupos  $23\pm 2$  °C y a  $5\pm 1$ °C durante 12 semanas y la sobrevivencia se determinó a 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11 y 12 semanas de almacenamiento. Mientras que la infectividad se midió al inicio del experimento en larvas de *G. mellonella* y a las 1, 2, 8, 10, 11 y 12 semanas. Encontrando que el porcentaje de IJs vivos fue significativamente diferente dependiendo de la temperatura de almacenamiento. Con respecto a la sobrevivencia, fue siempre superior al 95% durante 12 semanas cuando IJs se almacenaron a  $23 \pm 2$  C, mientras que el grupo que se mantuvo a  $5 \pm 1$  °C no mostró diferencias estadísticamente significativas durante las primeros 3 semanas; sin embargo, en la semana 5 se produjo una disminución notable y la tasa de sobrevivencia se mantuvo por debajo de 60%. En cuanto a las semanas 8, 10 y 12, la infectividad del grupo se mantuvo a  $23 \pm 2$  °C y fue superior con respecto al otro grupo. Lo cual sugiere que los resultados que nosotros obtuvimos al almacenar la suspensión de nematodos por 1, 2 y 3 semanas a 4, 8, 14, 20 y 24°C tuvo una efectividad del 65, 44 y 27 % respectivamente en todas las temperaturas. No obstante analizando el impacto de la temperatura individualmente a 4, 8, 14 y 20 °C el control supera el 70% mientras que a mayor temperatura (24°C) la mortalidad en larvas disminuye a un 30%, siendo la temperatura un factor determinante para conservar la efectividad de los nematodos y la persistencia de los adherentes en

una solución viable para ser usada en campo, siendo su vida de anaquel 3 semanas en coco, oliva y agua (Fig. 21). Esta información nos lleva a determinar que *S. colombiense* es una cepa viable para incorporarla en un manejo integrado de plagas en campo.

Por lo cual podemos determinar que aunque sean de la misma especie (*Sesteinernemtide*) muestran respuestas diferentes al factor temperatura.

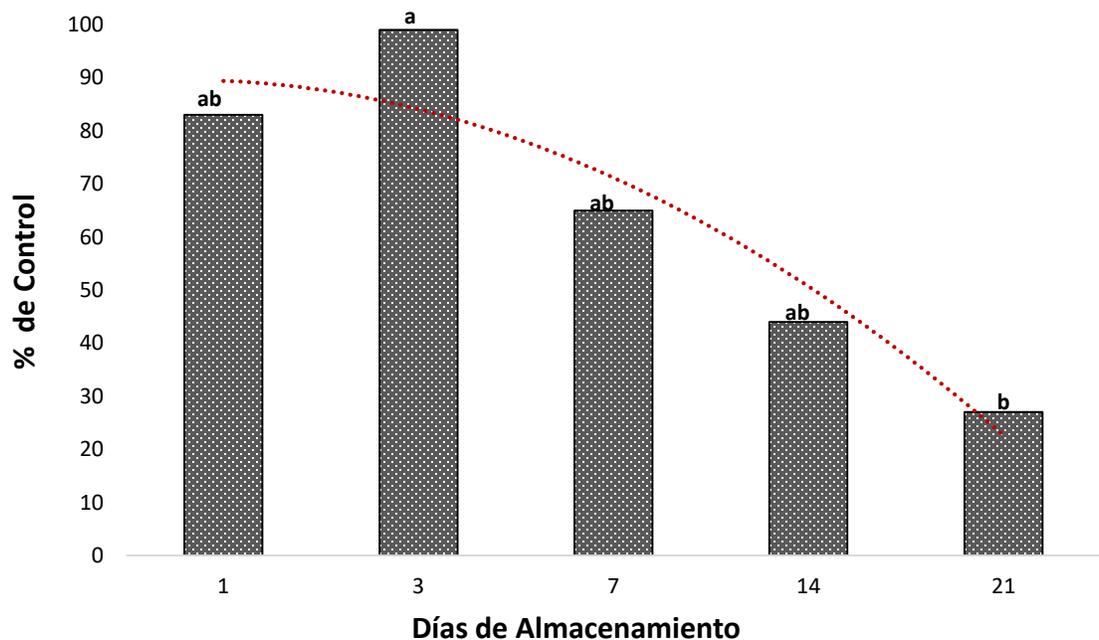


Figura 20. % de control encontrado en *G. mellonella* al ser expuestas a una suspensión de *S. colombiense* almacenada a diferentes días.

Con respecto a los adherentes, estos arrojaron que no hay diferencia significativa entre ellos ( $p=.004$ ). El uso de agua no es significativamente distinto ni de aceite de coco ni de aceite de oliva; pero entre el aceite de coco y aceite de oliva se ve una

ligera diferencia entre ellos ya que en aceite de oliva muere un 10%, más de larvas que en el aceite de coco, en estos mismos tratamientos se encontró que no había una diferencia estadística con el agua (Figura 21)

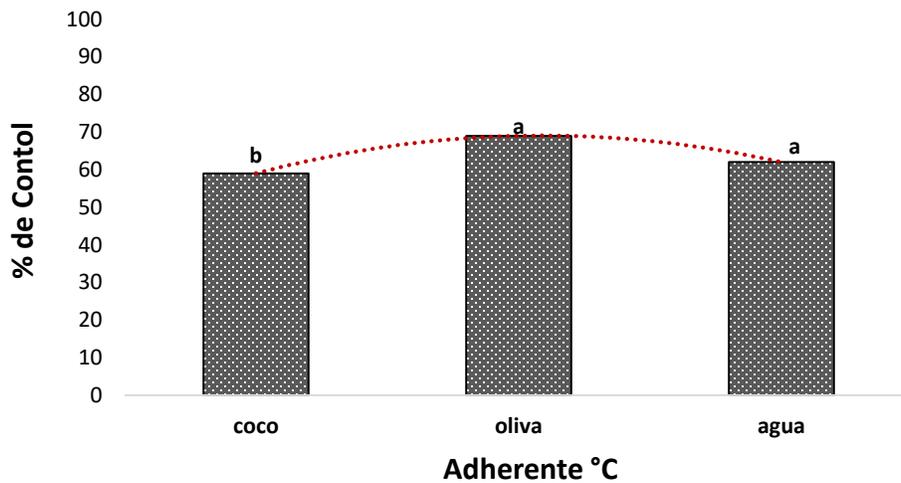


Figura 21. % de control de larvas de *G. mellonella* en función del adherente empleado.

Posteriormente las larvas muertas se separaron y se colocaron en cámaras húmedas para comprobar que la muerte haya sido causada por entomopatógenos, presentando el 100% de larvas muertas emergencia de IJs, indicador que comprueba el control alcanzado por los microorganismos (Figura 22).

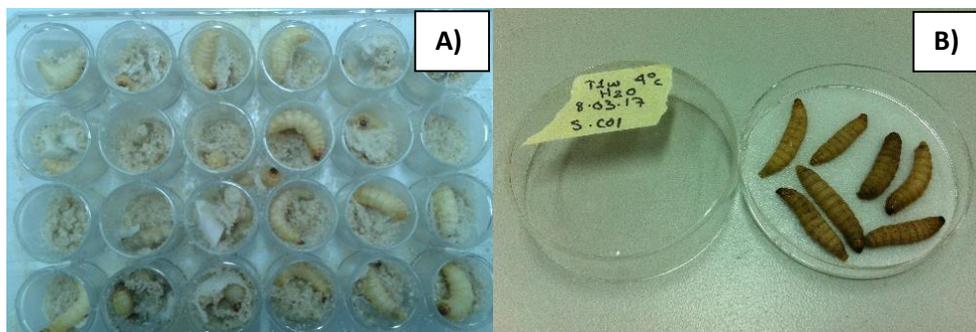


Figura 22. A) Monitoreo de unidades experimentales diariamente durante cuatro días. B) Conteo y separación de larvas muertas.

La información recopilada por Cruz-Martínez (2017) afirma que los ingredientes activos en las formulaciones son los NEPs y los portadores utilizados pueden ser sólidos, líquidos, geles, cadáveres y aditivos que tienen diferentes funciones, tales como absorbentes, adsorbentes, emulsionantes, tensoactivos, espesantes, dispersantes, antimicrobianos o bien protectores contra los rayos UV; todo estos con la finalidad de aumentar la sobrevivencia y mantener la virulencia. En dicha revisión se ha identificado que entre 4 y 15° C se ha alcanzado sobrevivencia de 6-12 meses para *Steinernema spp.* No obstante Grewal (2002) afirma que pueden sobrevivir de 1 a 3 meses a una temperatura de 5-10°C.

En contraste en el presente estudio se encontró sobrevivencia y efectividad a las 3 semanas de almacenamiento para el nematodo *S. colombiense* 4, 8, 14 y 20°C, si bien estos resultados no se acercan a la sobrevivencia y efectividad en otras cepas, la combinación de este nematodo con aceite de coco y oliva representa una formulación viable para la conservación de este nematodo ya que se registraron controles del 71, 86, 76 y 73% respectivamente para las temperaturas antes mencionadas. Aunado a estos resultados se identificó que 24°C es una temperatura que tiene un efecto negativo para almacenar a *S. colombiense* ya sea en agua, aceite de coco + agua o aceite de oliva + agua, ya que de manera general la sobrevivencia es mínima y esto repercute en la mortalidad, presentando únicamente un 30% de control en larvas de *G. mellonella*.

## VII. CONCLUSIONES

1. Se puede señalar que los resultados de sobrevivencia del nematodo *S. carpocapsae* se debe principalmente a la persistencia del aceite de coco y aceite de oliva, además la capacidad del nematodo para vivir en el a las 48, 96 y 144 h.
2. La incorporación de *S. westeri* + aceite de oliva a concentraciones de 200 nem/larva representa una alternativa en el manejo integrado de plagas, garantizando un efectividad acumulada del 67% (durante 14 días) en condiciones de campo.
3. La temperatura y el tiempo de almacenamiento tienen un efecto sobre la infectividad de *S. colombiense*, las suspensiones evaluadas (aceite de oliva + *S. colombiense* y aceite de coco + *S. colombiense*) mostraron sobrevivencia y efectividad después de 3 semanas de almacenamiento a 4, 8, 14 y 20°C. Sin embargo se deben realizar más estudios para evaluar otras cepas de NEPs y mejor el desempeño de estos formulados en diferentes plagas agrícolas de importancia económica en México.

## VIII. RECOMENDACIONES

1. Para el control de *S. frugiperda* que surge de los resultados obtenidos es: implementar aplicaciones de 200  $\mu$ L de la formulación de la cepa *S. westeri* + aceite de oliva (200 nem/larva) en la etapa vegetativa V4-V6 del cultivo de maíz.
2. Se sugiere evaluar *S. westeri* + aceite de oliva en parcelas demostrativas para que los agricultores puedan observar como las formulaciones biológicas minimizan el efecto nocivo de *S. frugiperda*. De esta manera se logrará un cambio en las prácticas agrícolas y favorecerá a un mejor rendimiento del cultivo.
3. Se recomienda llevar a cabo más estudios donde se evalúe el efecto de formulaciones de *H. bacteriophora*, *S. carpocapsae*, *S. colombiense* y *S. westeri* + adherentes que han permanecido almacenadas por diferentes tiempos y a distintas temperaturas sobre larvas de *S. frugiperda*.

## IX. LITERATURA CITADA

- Amador, M., Molina, D., Guillen, C., Parajeles, E., Jiménez, K., & Uribe, L. (2015). Utilización del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis atacamensis* CIA-NE07 en el control del picudo del banano *cosmopolites sordidus* en condiciones in vitro. *Agronomía Costarricense*, 39(3), 47-60.
- Aragón, F., Taba, S., Hernández Casillas, J., Figueroa, C. & Jdd, S. A. (2006). V. & Castro García, FH 2006. Catálogo de Maíces Criollos de Oaxaca.
- Arana, S., Challco, A., Álvarez, F., Villavicencio, N., & Meza, M. (2011). Manual de elaboración de biol. Soluciones Prácticas. Cusco–Perú.
- Badii, M. H., Flores, A. E. & Wong, L. J. G. (2000). Fundamentos y perspectivas de control biológico, Monterrey, México, Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Batalla-Carrera, L., Morton, A., & García-del-Pino, F. (2010). Efficacy of entomopathogenic nematodes against the tomato leafminer *Tuta absoluta* in laboratory and greenhouse conditions. *BioControl*, 55(4), 523-530.
- Batalla-Carrera, L., Morton, A., Shapiro-Ilan, D., Strand, M. R., & García-del-Pino, F. (2014). Infectivity of *Steinernema carpocapsae* and *S. feltiae* to larvae and adults of the hazelnut weevil, *Curculio nucum*: differential virulence and entry routes. *Journal of nematology*, 46(3), 281.
- Becerra, M. G., Juárez, F. B. & Zavala, M. M. R. (2013). Parasitismo en larvas del gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (Je Smith)(Lepidóptera: Noctuidae) en La Región de Pátzcuaro, Michoacán. *Ciencia y Tecnología*, Vol.1, 1: 33-36.

- Beck, B., Brusselman, E., Nuyttens, D., Moens, M., Pollet, S., Temmerman, F., & Spanoghe, P. (2013). Improving foliar applications of entomopathogenic nematodes by selecting adjuvants and spray nozzles. *Biocontrol Science and Technology*, 23(5), 507-520.
- Bolaños, T. A., Gutiérrez, G. A. M., Tinoco, C. E., Cortés-Martínez, C. I., & Sánchez, D. M. (2016). Loss caused by fruit worm and its treatment with entomopathogenic nematodes in fruits of *Physalis ixocarpa* Guenee.
- Bolaños, T. A., Vega, J. R. & Cruz, M. I. (2006). Control biológico del picudo negro (*Scyphophorus interstitialis* Gyllenhal) con nematodos y hongos entomopatógenos en agave en Oaxaca, México. *Revista Científica UDO Agrícola*, 6, 92-101.
- Bolognesi, C. (2003). Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 543, 251-272.
- Brusselman, E., Beck, B., Pollet, S., Temmerman, F., Spanoghe, P., Moens, M., & Nuyttens, D. (2012). Effect of spray volume on the deposition, viability and infectivity of entomopathogenic nematodes in a foliar spray on vegetables. *Pest management science*, 68(10), 1413-1418.
- Caccia, M. G., Del Valle, E., Doucet, M. E., & Lax, P. (2014). Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* and *Helicoverpa gelotopoeon* (Lepidoptera: Noctuidae) to the entomopathogenic nematode *Steinernema diaprepesi* (Rhabditida: Steinernematidae) under laboratory conditions. *Chilean journal of agricultural research*, 74(1), 123-126.

- Cagnolo, S., & Campos, V. (2008). Effect of storage temperature on survival and infectivity of *Steinernema rarum* (OLI strain)(Rhabditida: Steinernematidae). *Journal of invertebrate pathology*, 98(1), 114-115.
- Campos-Herrera, R., El-Borai, F. E., & Duncan, L. W. (2012). Wide interguild relationships among entomopathogenic and free-living nematodes in soil as measured by real time qPCR. *Journal of Invertebrate Pathology*, 111(2), 126-135.
- Campos-Herrera, R., Jaffuel, G., Chiriboga, X., Blanco-Pérez, R., Fesselet, M., Půža, V., ... & Turlings, T. C. (2015). Traditional and molecular detection methods reveal intense interguild competition and other multitrophic interactions associated with native entomopathogenic nematodes in Swiss tillage soils. *Plant and Soil*, 389(1-2), 237-255.
- Cano, E., López, J. A., Cano, E., Carballo, C. V. & Guharay, F. (2004). *Control biológico de plagas agrícolas*, Bib. Orton IICA/CATIE.
- Capinera, J. (1999). Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Je Smith)(Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). EENY-098, University of Florida IFAS Extension, 6 pp.
- Carballo, M., Guharay, F. & López, J. (2004). Control biológico de plagas agrícolas (Segundo tiraje), 36 pp.
- Castro, A., Cisneros, J. y Rojas J. (2012). Los insectos dañinos del maíz y alternativas biológicas para su manejo. *Revista Ecofronteras* 46:15-17.
- Choi, Y., Kim, Y., Ko, Y., Cha, E. S., Kim, J., & Lee, W. J. (2012). Economic burden of acute pesticide poisoning in South Korea. *Tropical Medicine & International Health*, 17(12), 1534-1543.

- Chueca, P., Garcerá, C., Moltó, E., Jacas Miret, J. A., & Urbaneja, A. (2009). Los aceites minerales pueden ser una alternativa al uso de acaricidas para el control de araña roja.
- Cruz-Martínez, H., Ruiz-Vega, J., Matadamas-Ortíz, P. T., Cortes-Martínez, C. I., & Rosas-Díaz, J. (2017). Formulation of Entomopathogenic Nematodes for Crop Pest Control-a Review. *Plant Protection Science*, 53(1).
- Debach, P. (1964). *The scope of biological control. In Biological Control of Insect Pests and Weeds*, London, Chapman and Hall Ltd.
- Del Bosque, L. A. R. & Bernal, H. C. A. (2007). *Teoría y Aplicación Del Control Biológico*, México, D.F., Sociedad Mexicana de Control Biológico.
- Del Valle, Eleodoro E, Lax, Paola, Rondán Dueñas, Juan, & Doucet, Marcelo E. (2013). Effects of insect cadavers infected by *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema diaprepesi* on *Meloidogyne incognita* parasitism in pepper and summer squash plants. *Ciencia e investigación agraria*, 40(1), 109-118.
- Delgado-Ochica, Y., & Sáenz Aponte, A. (2012). Virulencia, producción y desplazamiento de nematodos entomopatógenos sobre larvas del picudo de la guayaba *Conotrachelus psidii* Marshall:(Coleoptera: Curculionidae) en laboratorio. *Universitas Scientiarum*, 17(3), 283-290.
- Dequech, S. T. B., Fiuza, L. & Da Silva, R. (2004). Ocorrência de parasitóides de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)(Lep., Noctuidae) em lavouras de milho em Cachoeirinha, RS. *Ciênc. Rural*, 34, 1235-1237.
- Díaz, M. F., Ramírez, A. & Poveda, K. (2012). Efficiency of different egg parasitoids and increased floral diversity for the biological control of noctuid pests. *Biological Control*, 60, 182-191.

- Dito, D. F., Shapiro-Ilan, D. I., Dunlap, C. A., Behle, R. W., & Lewis, E. E. (2016). Enhanced biological control potential of the entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae*, applied with a protective gel formulation. *Biocontrol Science and Technology*, 26(6), 835-848.
- Erbaş, Z., Gökçe, C., Hazir, S., Demirbağ, Z., & Demir, I. (2014). Isolation and identification of entomopathogenic nematodes (Nematoda: Rhabditida) from the Eastern Black Sea region and their biocontrol potential against *Melolontha melolontha* (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 38(2), 187-197.
- Fernández, A. T., Wise, T. A. & Garvey, E. (2012). *Achieving Mexico's Maize Potential*, Tufts University.
- Fischbein, D. (2012). Introducción a la teoría del control biológico de plagas. In: De, I. N. & Agropecuaria, T. (eds.). Bariloche, Argentina: Laboratorio de Ecología de Insectos. EEA INTA Bariloche.
- García, L. C., Raetano, C. G. & Leite, L. G. (2008). Application technology for the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis indica* and *Steinernema* spp. (Rhabditida: Heterorhabditidae and Steinernematidae) to control *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) in corn. *Neotropical Entomology*, 37, 305-311.
- García, N. G. & Tarango, R. H. S. (2009). Manejo biorracional del gusano cogollero en maíz.
- Gaugler, R. & Kaya, H. K. (2000). *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*, Boston, United States, Library of Congress.

- Gianfelici, M., Bertolotti, M. A., & Cagnolo, S. R. (2014). Susceptibilidad de larvas de *Crociosema aporema* (Walsingham, 1914) y *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818, a tres aislados de nematodos entomopatógenos. *Revista de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 1(2), 71-76.
- Glazer, I., (2002). Survival Biology. In: Gaugler, R. (Ed.), *Entomopathogenic Nematology*. CABI Publishing, Wallingford, Oxfordshire, UK, pp. 169-187.
- Gözel, Ç., & Kasap, İ. (2015). Efficacy of entomopathogenic nematodes against the Tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Meyrick)(Lepidoptera: Gelechiidae) in tomato field. *Turkish Journal of Entomology*, 39(3).
- Grewal P.S. (2002): Formulation and application technology. en: Gaugler R. (ed.): *Entomopathogenic Nematology*. Oxfordshire, CABI: 265–287.
- Gutierrez-Ramírez, A., Robles-Bermudez, A., Santillan-Ortega, C., Ortíz-Catón, M. & Cambero-Campos, O. (2013). Control biológico como herramienta sustentable en el manejo de plagas y su uso en el estado de Nayarit, México. *Revista Bio Ciencias*, 2.
- Hajek, A. (2004). *Natural Enemies An Introduction to Biological Control*, New York, United States of America, Cambridge University Press. p. 378.
- Kaya, H. K., & Stock, S. P. (1997). Techniques in insect nematology. *Manual of techniques in insect pathology*, 1, 281-324 y 409.
- Kaya, H. K., Aguilera, M. M., Alumai, A., Choo, H., De la Torre, M., Fodor, A. & Ehlers, R. U. (2006). Status of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria from selected countries or regions of the world. *Biological control*, 38(1), 134-155.

- Lacey, L. A. (Ed.). (2012). Manual of techniques in invertebrate pathology. Academic Press. 1, pp 12.
- Laznik, Z., Vidrih, M., & Trdan, S. (2012). The effects of different fungicides on the viability of entomopathogenic nematodes *Steinernema feltiae* (Filipjev), *S. carpocapsae* Weiser, and *Heterorhabditis downesi* Stock, Griffin & Burnell (Nematoda: Rhabditida) under laboratory conditions. *Chilean journal of agricultural research*, 72(1), 62.
- León-García, I., Rodríguez-Leyva, E., Ortega-Arenas, L. D. & Solís-Aguilar, J. F. (2012). Susceptibilidad de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)(Lepidoptera: Noctuidae) a insecticidas asociada a césped en Quintana Roo, México. *Agrociencia*, 46, 279-287.
- Marín, J.A. (2001) Insectos plaga del maíz. Guía para su identificación. SAGARPA-INIFAP. Campo experimental bajo. Celaya, Gto. México. pp 29.
- Martínez, P. A. (2000) Plaguicida Biológico a base de quitosano. España. pp 2.
- Miret, J. A. J. (2005). *El control biológico de plagas y enfermedades*, Universitat Jaume I.
- Montoya, P. & Cancino, J. (2004). Control biológico por aumento en moscas de la fruta (Diptera: Tephritidae). *Folia Entomológica Mexicana*, 43, 257-270.
- Naranjo, N., Montero, D. A. V., & Aponte, A. S. (2012). Primer reporte de patogenicidad por nematodos entomopatógenos sobre la chinche de los pastos *Collaria scenica* Stål (Hemiptera: Miridae). *Entomotropica*, 26(3), 117-125.

- Navaneethan, T., Strauch, O., Besse, S., Bonhomme, A. & Ehlers, R.-U. (2010). Influence of humidity and a surfactant-polymer-formulation on the control potential of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* against diapausing codling moth larvae (*Cydia pomonella* L.) (Lepidoptera: Tortricidae). *BioControl*, 55, 777-788.
- Navon, A., Nagalakshmi, V. K., Levski, S., Salame, L., & Glazer, I. (2002). Effectiveness of entomopathogenic nematodes in an alginate gel formulation against lepidopterous pests. *Biocontrol Science and Technology*, 12(6), 737-746.
- Negrisoni, A. S., García, M. S., Barbosa Negrisoni, C. R. C., Bernardi, D. & Da Silva, A. (2010). Efficacy of entomopathogenic nematodes (Nematoda: Rhabditida) and insecticide mixtures to control *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) in corn crops. *Crop Protection*, 29, 677-683.
- Nicholls, C. I. (2008). *Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico*, Universidad de Antioquia. pp. 109-108.
- Noosidum, A., Satwong, P., Chandrapatya, A., & Lewis, E. E. (2016). Efficacy of *Steinernema spp.* plus anti-desiccants to control two serious foliage pests of vegetable crops, *Spodoptera litura* F. and *Plutella xylostella* L. *Biological Control*, 97, 48-56.
- Park, H. W., Kim, Y. O., Ha, J. S., Youn, S. H., Kim, H. H., Bilgrami, A. L., & Shin, C. S. (2011). Effects of associated bacteria on the pathogenicity and reproduction of the insect-parasitic nematode *Rhabditis blumi* (Nematoda: Rhabditida). *Canadian journal of microbiology*, 57(9), 750-758.

- Polanco, J. A. & Flores, M. T. (2008). Bases para una política de I&D e innovación de la cadena de valor del maíz. *Foro Consultivo Científico y Tecnológico, AC, México DF*, 244.
- Radhakrishnan, S., & Shanmugam, S. (2017). Bioefficacy of Entomopathogenic Nematodes against *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) in Bhendi. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 6(7), 2314-2319.
- Restrepo, J. I., & Aristizábal, I. D. (2010). Conservation of strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch cv. Camarosa) by edible coating application of sabila gel mucilage (*Aloe barbadensis* miller) and carnauba wax. *Vitae*, 17(3), 252-263.
- Rodríguez, M. G., Enrique, R., Gómez, L., Hernández-Ochandía, D., Miranda, I., Hernández, A., ... & Carolina, R. (2013). Impact of entomopathogenic nematode applications on diamond back moth population. *Revista de Protección Vegetal*, 28(2), 158-160.
- Ruíz, V. J., & Bolaños, A. T. (2003). Control biológico de gallina ciega *Phyllophaga vetula* Horn (Meloidae) bajo condiciones semicontroladas y de campo. In: Estudios sobre Coleópteros del suelo en Améric. México: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. P 299-331
- Saavedra, T. A., St Louis, L., Morales, M. C., Herrera, R. V., & Velázquez, E. P. (2010). Determinación del instar óptimo de *Spodoptera frugiperda* en la reproducción de *Heterorhabditis indica*. *Centro Agrícola*, 37(2), 19-25.
- Samish, M., & Glazer, I. (2001). Entomopathogenic nematodes for the biocontrol of ticks. *TRENDS in Parasitology*, 17(8), 368-371.
- Sánchez, J. A. C. (2001). Publicaciones del Programa Nacional de Etnobotánica Serie: Traducciones Número: 15. *Univarsidad Autonoma de Chapingo*.

- Santhi, V. S., Salame, L., Nakache, Y., Koltai, H., Soroker, V., & Glazer, I. (2015). Attraction of entomopathogenic nematodes *Steinernema carpocapsae* and *Heterorhabditis bacteriophora* to the red palm weevil (*Rhynchophorus ferrugineus*). *Biological Control*, 83, 75-81.
- Schroer, S., & Ehlers, R. U. (2005). Foliar application of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* for biological control of diamondback moth larvae (*Plutella xylostella*). *Biological Control*, 33(1), 81-86.
- Shapiro-Ilan, D. I., Cottrell, T. E., Mizell, R. F., Horton, D. L., Behle, R. W., & Dunlap, C. A. (2010). Efficacy of *Steinernema carpocapsae* for control of the lesser peachtree borer, *Synanthedon pictipes*: Improved aboveground suppression with a novel gel application. *Biological Control*, 54(1), 23-28.
- Soler, D. M., Gómez, L. & Sánchez, L. (2003). Formulación de nematodos entomopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*.
- Van Damme, V. M., Beck, B. K., Berckmoes, E., Moerkens, R., Wittemans, L., De Vis, R., ... & De Clercq, P. (2016). Efficacy of entomopathogenic nematodes against larvae of *Tuta absoluta* in the laboratory. *Pest management science*, 72(9), 1702-1709.
- Williams, T., Arredondo-Bernal, H. C. & Rodriguez-Del-Bosque, L. A. (2013). Biological pest control in Mexico. *Annu Rev Entomol*, 58, 119-40.