

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**Centro Interdisciplinario de Investigación para el
Desarrollo Integral Regional
Unidad Oaxaca**

**DOCTORADO EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO
DE RECURSOS NATURALES
ESPECIALIDAD EN PROTECCIÓN Y PRODUCCIÓN VEGETAL**

**EVALUACIÓN DE FORMULACIONES DE CEPAS NATIVAS DE NEMATODOS
ENTOMOPATÓGENOS PARA EL CONTROL DE GALLINA CIEGA (*Phyllophaga
vetula* Horn) EN MAÍZ (*Zea mays*)**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
PRESENTA**

SERGIO GIRÓN PABLO



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACION Y POSGRADO

ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez siendo las 13:00 horas del día 13 del mes de noviembre del 2012 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación del **Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca (CIIDIR-OAXACA)** para examinar la tesis de grado titulada: "Evaluación de formulaciones de cepas nativas de nematodos entomopatógenos para el control de gallina ciega (*Phyllophaga vetula* Horn) en maíz (*Zea mays*)".

Presentada por el alumno:

Girón Apellido paterno	Pablo materno	Sergio nombre(s)
		Con registro: B 0 8 1 4 7 2

aspirante al grado de: **DOCTORADO EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES**


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

LA COMISION REVISORA

Director de tesis:


Dr. Jaime Ruiz Vega


Dr. Rafael Pérez Pacheco


Dr. José Antonio Sánchez García


Dr. José Cruz Carrillo Rodríguez


Dr. Vicente Arturo Velasco Velasco

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO


Dr. Rafael Pérez Pacheco



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez el día 13 del mes noviembre del año 2012, el (la) que suscribe **Girón Pablo Sergio** alumno (a) del Programa de **DOCTORADO EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES** con número de registro **B081472**, adscrito al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Jaime Ruiz Vega y cede los derechos del trabajo titulado: "Evaluación de formulaciones de cepas nativas de nematodos entomopatógenos para el control de gallina ciega (*Phyllophaga vetula* Horn) 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 autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **Calle Hornos 1003, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca**, e-mail: posgradoax@ipn.mx ó serciidi@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Girón Pablo Sergio



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

RESUMEN

Los nematodos entomopatógenos (NE) son parásitos obligados en naturaleza, esto les confiere la posibilidad de ser utilizados como agentes de biocontrol en ambientes crípticos, por lo que representan una buena alternativa al uso de insecticidas químicos para el control de plagas del suelo. Sin embargo, su eficacia depende de factores como humedad, temperatura, pH, materia orgánica y textura del suelo, por lo que se recomienda que se aislen especies nativas de la región donde deseen utilizarse, para aumentar con ello las probabilidades de éxito. El presente estudio tuvo como finalidad aislar nematodos nativos de suelos de los Valles Centrales de Oaxaca y evaluarlos en laboratorio para determinar su potencial para el control de gallina ciega (*Phyllophaga vetula*). Se colectaron 55 muestras de suelo en el periodo de agosto a octubre de 2008; resultando el 49% aparentemente positivas. De este total, el 81% correspondió al género *Steinernema* y el 19% a *Heterorhabditis* (de acuerdo con la coloración que adquirieron las larvas infectadas). Los 27 biotipos colectados, se aplicaron a larvas de *Galleria mellonella* para seleccionar los cinco que causaran la mayor mortalidad, seleccionando dos del género *Steinernema* y tres del género *Heterorhabditis*. Once de los biotipos no produjeron IJ en abundancia o las larvas se descompusieron debido al ataque de hongos. Cuatro de los biotipos seleccionados se aislaron en Cuilapam de Guerrero (dos steinernemátidos y dos heterorhabdítidos) y uno se encontró en Lachigoló, Tlacolula (heterorhabdítido). Al evaluar estos cinco biotipos para el control de gallina ciega (*Phyllophaga vetula*), se encontraron diferencias estadísticas para las dosis. En cuanto a dosis letales para eliminar el 50 y el 95% de larvas de gallina ciega, fueron los heterorhabdítidos los que requirieron las menores dosis en ambos casos; la DL_{50} para los heterorhabdítidos varió de 326 a 348 IJ por larva, mientras que para los steinernemátidos fue de 382 a 405 IJ por larva. Las DL_{95} para los primeros variaron de 602 a 726 IJ por larva y para los segundos de 920 a 998 IJ por larva. En el caso de tiempos letales para eliminar el 50 y el 95% de larvas de gallina ciega, también fueron los heterorhabdítidos los que presentaron los menores tiempos, variando de 2.7 a 3.1 días para TL_{50} y de 6.2 a 7.1 para TL_{95} , mientras que los steinernemátidos mostraron TL_{50} de 4.0 a 4.1 días y TL_{95} de 9.8 a 10.3 días. Utilizando el

procedimiento de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), se identificaron las especies *Heterorhabditis mexicana*, *Steinernema carpocapsae* y *Steinernema feltiae*. Esta es la primera referencia a la presencia de la especie *Heterorhabditis mexicana* en Oaxaca.

Palabras clave: Nematodos entomopatógenos, *Phyllophaga vetula*, *Steinernema*, *Heterorhabditis*.

ABSTRACT

The entomopathogenic nematodes (EPN) are obligate parasites of insects living in cryptic habitats, which render them as alternative to the chemical control of these pests. However, their control efficacy depends of factors such as humidity, temperature, pH, and soil organic matter and texture. Therefore it is advisable to isolate native species to increase success probabilities. This study was aimed to isolate native EPN from agricultural soils in The Valles Centrales of Oaxaca Region and to evaluate their potential for control of white grubs (*Phyllophaga vetula*), a total of 55 samples were collected from August to October, 2011. After baiting with *Galleria mellonella* larvae, twenty seven (49%) of these were apparently positive for EPN. According to the dead larvae color, the genus *Steinernema* represented 81%, while the genus *Heterorhabditis* represented 19% of the total. The 27 isolated biotypes were applied to *G. mellonella* larvae to select the five isolates causing the largest control. Two *Steinernema* and three *Heterorhabditis* biotypes were selected. Eleven isolates did not produce IJ's in large numbers or the larvae rot because of fungal infections. Four of the most effective biotypes (two *Steinernema* and two *Heterorhabditis*) were collected in Cuilapam, Zaachila; while one *Heterorhabditis* was collected in Lachigoló, Tlacolula. When these isolates were bioassayed against third instar *Phyllophaga vetula* larvae, significant differences ($P < 0.05$) were found for genus and dosages. Regarding the lethal dosages to obtain 50 and 95% control, the *Heterorhabditis* species required the smaller dosages as the DL_{50} for them ranged from 326 to 348 IJ per larva, while for the Steinernematidae it was 382 to 405 IJ per larva. Also, the DL_{95} for the first

group were 602 to 726 IJ per larva, and from 920 to 998 IJ per larva for the second. Lethal times to control 50 and 95% of the larval population were also smaller for the Heterorhabditidae, which showed TL_{50} values from 2.7 to 3.1 days and TL_{95} values from 6.2 to 7.1 days; the steinernematidae showed TL_{50} values of 4.0 to 4.1 days and TL_{95} of 9.8 to 10.3 days. Using PCR techniques, the species *Heterorhabditis mexicana*, *Steinernema carpocapsae* and *Steinernema feltiae* were identified. This is the first report of *H. mexicana* in Oaxaca.

Key words: entomopathogenic nematodes, *Phyllophaga vetula*, *Steinernema*, *Heterorhabditis*.

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 doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y al Programa Institucional de Formación de Investigadores del IPN por el apoyo brindado para la realización de mis estudios.

Al Dr. Jaime Ruiz Vega Director de mi Proyecto de Investigación, que con su amplia experiencia en el campo de la investigación y su atinada guía permitió llevar a buen término este trabajo.

Al Dr. Rafael Pérez Pacheco miembro del Comité Revisor por sus atinadas sugerencias y correcciones, resultado de su amplio conocimiento científico en el campo de los nematodos.

Al Dr. José Antonio Sánchez García miembro del Comité Revisor por su amplia revisión al escrito y sus atinadas correcciones y observaciones.

Al Dr. Celerino Robles Pérez por su asesoría en el análisis de los resultados, su exhaustiva revisión al escrito y sus productivas correcciones y observaciones.

A la Dra. Yolanda Donají Ortiz Hernández por sus invaluable consejos y orientación para incursionar en el campo de la investigación.

Al Dr. José Cruz Carrillo Rodríguez miembro del Comité Revisor por su gran apoyo en la revisión del escrito y sus atinadas observaciones, producto de su gran experiencia en el campo de la investigación.

Al Dr. Vicente Arturo Velasco Velasco miembro del Comité Revisor por su gran apoyo en la revisión del escrito y sus atinadas observaciones como experto en el campo de la estadística.

A Amanda Hodson de la Universidad de Davis, California por haber hecho la identificación de los nematodos a través de la técnica PCR.

Al Dr. Teodulfo Aquino Bolaños por brindarme asesoría y compartir todo el cúmulo de conocimientos y experiencia que posee en el campo de los nematodos entomopatógenos.

Al M. en C. Julián Hernández Cruz por su valioso apoyo intelectual y operativo en todo momento.

A Demetrio Noriega Bautista y Nelly Guadalupe Girón Ramírez por su apoyo en la elaboración del documento de tesis en medio magnético.

Al joven Valentín Aragón López por su invaluable apoyo en el manejo del software, para la elaboración del documento en medio magnético.

A la M. en C. María Eugenia Silva Rivera por su gran amistad y apoyo moral en todo momento.

A todas y cada una de las personas que colaboraron para la obtención de esta tesis, GRACIAS.

DEDICATORIAS

A la Inteligencia Perfecta que rige la vida.

A mis padres Margarito Girón y Rafaela Pablo que han dado su vida misma por apoyarme a mí y mi familia, brindándonos además la mayor riqueza que es el amor y el ejemplo en el trabajo.

A mi esposa Araceli Solorza que ha estado a mi lado hombro con hombro, en los momentos buenos y malos de nuestra vida, dándome fortaleza y enseñándome que el amor es la única fuerza que vence toda adversidad y para la cual no hay imposibles; y a nuestras hijas Viany y Niza, que son nuestros tesoros. Para mi esposa y mis dos hijas que son mis tres amores, la dedicación especial de este trabajo.

A mis hermanos Cenobio, Miguel Ángel, Abel^t, Herminia y Elia porque en ellos siempre he encontrado apoyo y comprensión.

A mis cuñadas María Leticia y Teresa y mi cuñado Julián, quienes han fomentado una armonía familiar que reconforta y permite seguir adelante.

A mis sobrinos Víctor, José Manuel, Miguel Ángel, Didier y Josué y a mi sobrina Nelly su hija Dolet y su esposo Demetrio quienes han llenado de alegría nuestros corazones.

A mis suegros Álvaro Solorza y Elvia Gómez que nos han apoyado incondicionalmente en todo momento, mostrándonos su amor y aprecio. Y a mis cuñados Álvaro y Wilver por todas las muestras de cariño y apoyo hacia mí y mi familia.

A todos aquellos que de una o de otra manera me han apoyado a lo largo de mi vida.

INDICE

Sección	Pág.
RESUMEN.....	I
ABSTRACT.....	II
LISTA DE CUADROS.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	XI
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	2
3. JUSTIFICACIÓN.....	6
4. HIPÓTESIS.....	6
5. OBJETIVOS.....	7
6. REVISIÓN DE LITERATURA.....	9
6.1 La plaga de “gallina ciega” (<i>Phyllophaga</i> spp).....	9
6.1.1 Taxonomía de <i>Phyllophaga</i>	10
6.1.2 Descripción y biología.....	10
6.1.3 Daños causados.....	14
6.2 Alternativas para el control de plagas.....	15
6.2.1 Nematodos entomopatógenos (NE).....	15
6.2.1.1 Taxonomía de los NE.....	16
6.2.1.2 Morfología.....	16
6.2.1.3 Comportamiento.....	16
6.2.1.4 Ciclo biológico.....	17
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
7.1 Muestreo de suelos.....	20
7.2 Experimento 1.- Selección de cinco biotipos por mortalidad causada a <i>Galleria mellonella</i>	21
7.3 Experimento 2.- Evaluación de los cinco biotipos por mortalidad causada a <i>Tenebrio molitor</i>	22
7.4 Experimento 3.- Evaluación de los cinco biotipos por mortalidad causada a <i>Phyllophaga vetula</i>	24
7.5 Experimento 4.- Evaluación de los cinco biotipos en tres formulaciones y dos humedades.....	25
7.6 Experimento 5.- Evaluación de la vida de anaquel de los cinco biotipos en tres formulaciones.....	27
7.7 Experimento 6.- Evaluación de tres biotipos en experimento semicontrolado.....	28

7.8 Identificación de biotipos.....	30
7.9 Análisis de correlación y regresiones.....	31
8. RESULTADOS.....	32
8.1 Muestreo de suelos.....	32
8.2 Experimento 1.- Selección de cinco biotipos por mortalidad causada a <i>Galleria mellonella</i>	33
8.3 Experimento 2.- Evaluación de los cinco biotipos por mortalidad causada a <i>Tenebrio molitor</i>	34
8.3.1 Dosis y tiempos letales en <i>Tenebrio molitor</i>	36
8.4 Experimento 3.- Evaluación de los cinco biotipos por mortalidad causada a <i>Phyllophaga vetula</i>	37
8.4.1 Dosis y tiempos letales en <i>Phyllophaga vetula</i>	39
8.5 Experimento 4.- Evaluación de los cinco biotipos en tres formulaciones y dos humedades.....	40
8.6 Experimento 5.- Evaluación de la vida de anaquel de los cinco biotipos en tres formulaciones.....	42
8.7 Experimento 6.- Evaluación de tres biotipos en experimento semicontrolado.....	44
8.7.1 Evaluación de persistencia en el experimento Semicontrolado.....	46
8.8 Identificación de biotipos.....	47
8.9 Análisis de correlación y regresiones.....	47
8.9.1 Mortalidad de <i>Galleria mellonella</i> con relación al pH.....	48
8.9.2 Mortalidad de <i>Galleria mellonella</i> con relación a materia orgánica.....	49
8.9.3 Mortalidad de <i>Galleria mellonella</i> con relación a arena...	51
8.9.4 Mortalidad de <i>Galleria mellonella</i> con relación a arcilla...	52
8.9.5 Mortalidad de <i>Galleria mellonella</i> con relación a limo.....	54
9. DISCUSIÓN.....	56
10. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	62
11. LITERATURA CITADA.....	64
12. ANEXOS.....	72

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Mortalidad de <i>Galleria mellonella</i> causada por los biotipos de nematodos entomopatógenos aislados de las muestras de suelo.....	33
2	Biotipos con mayores porcentajes de mortalidad sobre <i>Galleria mellonella</i> y su código de denominación.....	34
3	Comparación de medias de porcentaje de mortalidad de <i>Tenebrio molitor</i> entre tratamientos.....	35
4	Comparación de medias de porcentaje de mortalidad de <i>Tenebrio molitor</i> entre biotipos.....	36
5	Comparación de medias de porcentaje de mortalidad de <i>Tenebrio molitor</i> entre dosis.....	36
6	Dosis (50 y 95) y tiempos letales (50 y 95) para cada una de los biotipos estudiados aplicados a larvas de <i>Tenebrio molitor</i>	37
7	Comparación de medias de porcentaje de mortalidad de <i>Phyllophaga vetula</i> entre tratamientos.....	38
8	Comparación de medias de porcentaje de mortalidad de <i>Phyllophaga vetula</i> entre biotipos.....	39
9	Comparación de medias de porcentaje de mortalidad de <i>Phyllophaga vetula</i> entre dosis.....	39
10	Dosis (50 y 95) y tiempos letales (50 y 95) para cada una de los biotipos estudiados aplicados a <i>Phyllophaga vetula</i>	40
11	Comparación de medias entre biotipos, de acuerdo con la mortalidad causada a <i>Phyllophaga vetula</i>	41
12	Comparación de medias entre formulaciones, de acuerdo con la mortalidad causada a <i>Phyllophaga vetula</i>	41
13	Comparación de medias entre niveles de humedad, de acuerdo con la mortalidad causada a <i>Phyllophaga vetula</i>	42

14	Porcentaje de sobrevivencia de cinco biotipos de nematodos en tres diferentes formulaciones y en cuatro tiempos diferentes.....	43
15	Comparación de medias de porcentaje de mortalidad de <i>P. vetula</i> entre tratamientos en el experimento 6.....	44
16	Porcentaje de mortalidad causada a <i>P. vetula</i> , de acuerdo con el biotipo de nematodo utilizado en el experimento semicontrolado de campo.....	45
17	Porcentaje de mortalidad causada a <i>P. vetula</i> , de acuerdo con el tipo de formulación utilizada en el experimento semicontrolado de campo.....	45
18	Correlación existente entre el porcentaje de mortalidad de larvas de <i>Galleria mellonella</i> y los factores pH, materia orgánica, arena, arcilla y limo.....	47

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página	
1	Ciclo de vida anual de “gallina ciega” (<i>Phyllophaga</i> sp).....	11
2	Huevecillos de <i>Phyllophaga</i> sp.....	12
3	Larva, pupas y adulto de <i>Phyllophaga</i> sp.....	13
4	Ciclo de vida de los nematodos entomopatógenos (Tomado de Dirt Works, 2001).....	19
5	Gráfica de dispersión, línea de tendencia polinómica, ecuación de regresión y R^2 , para la relación que se da entre las variables porcentaje de mortalidad de <i>G. mellonella</i> y pH.....	49
6	Gráfica de dispersión, línea de tendencia potencial, ecuación de regresión y R^2 , para la relación que se da entre las variables porcentaje de mortalidad de <i>G. mellonella</i> y porcentaje de materia orgánica.....	51
7	Gráfica de dispersión, línea de tendencia polinómica, ecuación de regresión y R^2 , para la relación que se da entre las variables porcentaje de mortalidad de <i>G. mellonella</i> y porcentaje de arena.....	52
8	Gráfica de dispersión, línea de tendencia logarítmica, ecuación de regresión y R^2 , para la relación que se da entre las variables porcentaje de mortalidad de <i>G. mellonella</i> y porcentaje de arcilla.....	54
9	Gráfica de dispersión, línea de tendencia polinómica,	

ecuación de regresión y R^2 , para la relación que se da
entre las variables porcentaje de mortalidad de *G.*
mellonella y porcentaje de limo..... 55

1. INTRODUCCIÓN

El uso indiscriminado de plaguicidas en los cultivos, ha causado diversos problemas de contaminación en los suelos, aire y cuerpos de agua, además de que muchas plagas se han vuelto resistentes, lo que ha obligado a aumentar cada vez más las dosis de aplicación o a hacer mezclas de varios plaguicidas, haciendo incosteable el cultivo, y cada vez más resistentes a las plagas, con el consecuente aumento en el deterioro del ambiente. Ante esta situación se han buscado alternativas para el control de plagas, que sean más amigables con el medio ambiente y que no resulten en un costo demasiado alto; una de ellas es el control biológico, que consiste en determinar qué enemigos naturales posee la plaga, y estudiar todo lo relacionado con estas para poder aplicarlos como control. En el caso específico de la plaga de suelo gallina ciega (*Phyllophaga* spp), daña las raíces de una gran variedad de plantas, al alimentarse de ellas, tiene como uno de sus enemigos naturales a los nematodos entomopatógenos (NE) de las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae, los cuales son parásitos obligados en la naturaleza, es decir, requieren de un hospedero para completar su ciclo, y la gallina ciega es uno de ellos. El tercer estadio emerge del cadáver del hospedero y puede permanecer por meses en el suelo hasta encontrar un nuevo hospedero, esto les da la posibilidad de que con una aplicación que se haga puedan establecerse de manera permanente; sin embargo, no se puede generalizar en el sentido de que cualquier especie de NE puede ser efectiva para controlar cualquier especie de gallina ciega, puesto que su eficacia depende de factores como humedad, temperatura, pH, materia orgánica y textura del suelo, por lo tanto, se requiere de experimentar para determinar, cual especie de NE es la más efectiva para controlar la plaga de interés; es por ello que cuando un nuevo nematodo es aislado de muestras de campo, es inevitable evaluarlo en laboratorio, antes de aplicarlo como biocontrol. La efectividad de los nematodos entomopatógenos para el control de plagas depende también de factores como la compatibilidad con la plaga y el ambiente, grado de virulencia, capacidades de persistencia y de búsqueda; es por ello recomendable que para controlar determinada plaga, su enemigo natural pueda aislarse del mismo medio en que esta se desarrolla para que presente las mejores condiciones de adaptación y compatibilidad con la plaga y

no genere alteraciones en el equilibrio ecológico existente en el área. En el presente trabajo se aislaron nematodos entomopatógenos de muestras de suelo colectadas en los Valles Centrales de Oaxaca, los cuales fueron evaluados en diferentes formulaciones para determinar su potencial para el control de la gallina ciega (*Phyllophaga vetula* Horn), se determinó el porcentaje de mortalidad que causaron a la larva y mediante el análisis Probit (SAS, 1988) se determinaron dosis y tiempos letales; de tal manera que se generó la información necesaria para poder utilizarlos para el control de la plaga mencionada en la región de los Valles Centrales de Oaxaca. Utilizando el procedimiento Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), se identificaron los cinco biotipos con mayor potencial en el control de la mencionada plaga. También se analizó la correlación existente entre la presencia de nematodos entomopatógenos en las muestras de suelo y los factores pH, materia orgánica, porcentaje de arena, arcilla y limo.

2. ANTECEDENTES

El control biológico moderno está claramente basado en el fenómeno interespecífico de población y se apoya en el hecho de que la población de una especie permanece en una inmediata y funcional relación para otra especie (Dout, 1982); en el caso de los nematodos entomopatógenos (NE) de las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae son parásitos obligados en la naturaleza, y necesitan de un hospedero para reproducirse (Kaya y Koppenhofer, 1996). Sus hospederos son escarabajos del complejo “gallina ciega” (Coleoptera: Scarabeidae) que en su gran mayoría son plagas de la raíz de diversos cultivos de importancia comercial (Koppenhofer, *et al.*, 2005) Esta característica les ha conferido el potencial de agentes de control biológico, puesto que matan a su hospedero del cual emergen en estado infectivo juvenil (IJ) para buscar otras presas.

La definición clásica de control biológico es “el uso de depredadores, parasitoides y organismos patógenos para reducir la densidad de población de organismos plaga, y por lo tanto el daño causado por éstos a un nivel más bajo

que el que se presentaría si no estuviera presente el enemigo natural” (García *et al.*, 1988).

La transmisión de los organismos patógenos entre los individuos de las poblaciones de insectos se da mediante dos tipos de transmisión: horizontal y vertical; la horizontal ocurre entre miembros del mismo estado de vida y usualmente entre miembros de la misma generación. El inóculo u organismo patógeno se distribuye por el aire, por efecto de la lluvia, por contacto con insectos infectados, por consumir plantas contaminadas con el inóculo, etc. La transmisión vertical ocurre entre miembros de dos generaciones sucesivas e incluye pasar el inóculo o el organismo patógeno de padres a hijos (Van y Bellows, 1996).

Varias características del organismo patógeno influyen en el éxito que presente en la reducción del organismo plaga, dentro de ellas se encuentran: infectividad, virulencia, producción de toxinas, naturaleza del ciclo de vida del patógeno, densidad del inóculo, distribución y persistencia (Van y Bellows, 1996).

El éxito que presentan algunos NE en condiciones de laboratorio, en ocasiones no es el mismo cuando se llevan a condiciones de campo, puesto que en este caso existen factores ecológicos que pueden restringir el contacto del NE con su hospedero, por esa razón es necesario validar los datos obtenidos en laboratorio, llevándolos a campo (Van y Bellows, 1996).

Es necesario tener claro que en la naturaleza la densidad de las poblaciones de insectos o de organismos plaga no sólo están en función de la interrelación con sus enemigos naturales, sino que también son afectados por factores exógenos que pueden afectar su población tales como heladas, lluvias, incendios, etc. (Van y Bellows, 1996).

Cuando las condiciones le favorecen al patógeno (como podría ser el caso de los NE) pueden permanecer en el suelo o en el medio en donde fueron aplicados y establecerse ahí de tal manera que pueden afectar nuevas

generaciones de la plaga, si esto sucede, es bastante benéfico pues se elimina la necesidad de estar aplicando el agente de control nuevamente, disminuyendo costos de manera importante. Esto es lo que se buscaría idealmente al aplicar el control biológico (Van y Bellows, 1996).

En el uso de NE como agentes de control biológico no se puede generalizar en el sentido de que tal o cual especie de NE es la que puede controlar cualquier tipo de escarabajo, sino que más bien se requiere de experimentar para determinar cual especie de NE es más adecuada para controlar determinada especie de escarabajo (Koppenhofer, *et al.*, 2005).

Los nematodos entomopatógenos de los géneros *Heterorhabditis* y *Steinernema* (Rhabditida: Heterorhabditidae y Steinernematidae) existen en suelos con vegetación natural y en suelos agrícolas alrededor del mundo (Hominick, 2002) y son usados para control biológico de plagas de insectos (Koppenhofer y Fuzy, 2006).

Cuando un nuevo NE es aislado de muestras de campo, es inevitable evaluarlo en laboratorio, antes de aplicarlo en campo (Wang y Grewal, 2002). Sin embargo, el mantenerlo en laboratorio en otro tipo de hospedero (comúnmente en *Galleria mellonella*) puede causar pérdida de características de adaptación a su hábitat natural, lo cual puede significar falta de efectividad para controlar la plaga de interés cuando nuevamente sea liberado en campo (Roush, 1990). Una forma que Roush (1990) sugiere para minimizar la pérdida de características de adaptación es conservar los aislados de NE en laboratorio las menos generaciones posibles.

Todas las formulaciones de NE son hechas con IJ debido a que en este estado de vida el nematodo no se alimenta y puede permanecer en latencia en espera de encontrar un hospedero (Shapiro-Llan *et al.*, 2001).

La larva de *Galleria mellonella* es el insecto más comúnmente utilizado para la producción *in vivo* de NE (Grewal y Georgis, 1998) porque este produce

grandes cantidades de nematodos, comercialmente esta altamente disponible y es muy susceptible a la infección (Woodring y Kaya, 1988).

El almacenamiento y aplicación de NE en cadáveres infectados es un método prometedor para el combate de plagas de suelo, además, la aplicación en cadáveres infectados podría reducir los costos de producción en la producción de NE *in vivo* porque se eliminan los pasos de cosecha y concentración del nematodo (Shapiro-Llan *et al.*, 2001).

Los NE de las familias Heterorhabditidae y Steinernematidae tienen gran potencial como agentes de control biológico de muchas plagas de insectos (Grewal *et al.*, 2005). Estos nematodos poseen muchos atributos deseables incluyendo amplio rango de hospederos, seguridad para organismos no blanco y el medio ambiente, excepción de registro en muchos países, fácil producción masiva y aplicación, habilidad para buscar la plaga, potencial de establecerse en el medio ambiente y reciclarse, entre otros (Kaya y Gaugler, 1993).

Varios factores edáficos tales como textura, humedad y pH, han sido reportados que influyen en la presencia de NE en el suelo (Lacey y Kaya, 2000). Los parámetros tales como pH, estructura y fertilidad pueden ayudar a predecir la existencia de nematodos en determinados suelos. Es muy probable encontrar estos organismos en suelos con relativamente alto contenido de arena, bajo pH y relativamente alta fertilidad en términos de nutrientes disponibles. La interacción de estos factores con las actividades de manejo pueden influenciar no sólo la presencia natural de estos organismos, sino también su persistencia en determinado sitio (Alumai, *et al.*, 2005).

3. JUSTIFICACIÓN

La diversidad de especies de insectos y sus enemigos naturales tales como depredadores, parasitoides y organismos patógenos es alta en el estado de Oaxaca. En el caso específico de nematodos entomopatógenos, era necesario realizar una colecta intensiva de muestras de suelo en la región Valles Centrales para detectar, aislar e identificar posibles especies, además de evaluar su potencial para el control de gallinas ciegas (*Phyllophaga* spp.). También debieron evaluarse distintas formulaciones de estos organismos, de tal manera que se garantizara su máxima viabilidad en cuanto a infectividad y virulencia, aunada al mayor tiempo posible de vida de anaquel y persistencia en el suelo. Fue fundamental también analizar la correlación existente entre la presencia de nematodos entomopatógenos en las muestras de suelo y los factores pH, materia orgánica, porcentaje de arena, arcilla y limo, de tal manera que pudiera establecerse algún tipo de modelo de predicción de la presencia de NE, en función de los factores mencionados.

4. HIPÓTESIS

Es posible aislar e identificar especies nativas de nematodos entomopatógenos en los Valles Centrales de Oaxaca y aplicarlos en formulaciones adecuadas para el control eficaz de la plaga gallina ciega (*Phyllophaga vetula* Horn).

La presencia de nematodos entomopatógenos en el suelo esta correlacionada con los factores edáficos pH y porcentajes de materia orgánica, arena, arcilla y limo.

5. OBJETIVOS

Aislar e identificar especies de nematodos entomopatógenos nativos de los Valles Centrales de Oaxaca.

Determinar en laboratorio las cinco mejores especies nativas de nematodos entomopatógenos en función de la mortalidad causada al hospedero *Galleria mellonella*.

Determinar en laboratorio las dosis y tiempos letales medios de las cinco mejores especies nativas de nematodos entomopatógenos (previamente seleccionadas con el hospedero *Galleria mellonella*), utilizando como hospedero a *Tenebrio molitor*.

Determinar en laboratorio las dosis y tiempos letales medios de las cinco mejores especies nativas de nematodos entomopatógenos (previamente seleccionadas con el hospedero *Galleria mellonella*), utilizando como hospedero a *Phyllophaga vetula* Horn.

Evaluar para el control de *Phyllophaga vetula* Horn las formulaciones cadáver infectado de *Galleria mellonella*, pellets de arcilla y aplicación en medio acuoso de las cinco especies nativas de nematodos entomopatógenos seleccionadas con el hospedero *Galleria mellonella*, e identificar la mejor formulación.

Evaluar el tiempo de vida de anaquel de las cinco especies nativas de nematodos entomopatógenos seleccionadas con el hospedero *Galleria mellonella*, formuladas en cadáver infectado de *Galleria mellonella*, pellets de arcilla y medio acuoso.

Evaluar en un experimento semicontrolado de campo las tres especies nativas de nematodos entomopatógenos (previamente seleccionadas en laboratorio por presentar las mejores dosis y tiempos letales), aplicadas en formulaciones de cadáver infectado de *Galleria mellonella*, pellets de arcilla y medio acuoso en cuanto al control de *Phyllophaga vetula*.

Evaluar la capacidad de persistencia en el suelo de las tres especies nativas de nematodos entomopatógenos (previamente seleccionadas en laboratorio por presentar las mejores dosis y tiempos letales), identificando la formulación que propicie más su persistencia.

Determinar la correlación existente entre las variables pH y porcentajes de materia orgánica, arena, arcilla y limo y la presencia de nematodos entomopatógenos en las muestras de suelo.

6.1 REVISIÓN DE LITERATURA

6.1 La plaga de “gallina ciega” (*Phyllophaga* spp.)

Como “gallina ciega” se conocen las larvas de diversas especies de escarábidos de los géneros *Phyllophaga*, *Macrodactylus*, *Euetheola*, *Cyclocephala*, *Anomala* y otras que causan serios daños al maíz en el centro de México (Villalobos, 1992); pero, la distribución de “gallina ciega” abarca prácticamente todo el país (SARH, 1988).

En algunas entidades, como Jalisco, se han calculado pérdidas de 920 a 1,600 kg ha⁻¹ de grano por causa del complejo de insectos rizófagos. La distribución de esta plaga abarca todas las zonas productoras de maíz, con variación en la predominancia de especies en las distintas regiones, su ocurrencia se ha registrado en las siguientes entidades: Sonora, Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guanajuato, Zacatecas, Durango, Tamaulipas, Chihuahua, Morelos, México, Puebla, Veracruz, Oaxaca y Chiapas. Algunas de las especies mencionadas atacan también a sorgo, caña de azúcar, cafetales, pastos y algunos cultivos hortícolas y ornamentales (SARH, 1988).

En México, el género *Phyllophaga* se ubica dentro de los más importantes por el daño que causan al sistema radicular de diversos cultivos (Morón, 1983). Se tienen reportadas para este género más de 250 especies (Morón, 1986). El área que afectan se ha estimado que alcanza altas densidades, causando daños en cultivos en 500,000 hectáreas, las cuales están distribuidas en toda la República Mexicana (Romero, 1980). Afectan de manera particular la producción de maíz, las pérdidas en este cultivo son estimadas en 400 a 1,300 kg ha⁻¹ (Villalobos, 1992).

Morón (1986) menciona que las especies de *Phyllophaga* spp. muestran una compleja distribución en las montañas y planicies mexicanas, derivada de sus propios movimientos de invasión, de su tolerancia climática y de sus activos procesos de diversificación.

6.1.1 Taxonomía de *Phyllophaga*

Reino: Animal

Clase: Insecta

Orden: Coleoptera

Familia: Melolonthidae

Subfamilia: Melolonthinae

Tribu: Melolonthini

Subtribu: Rhizotrogina

Género: *Phyllophaga*

Especie: spp.

Clasificación según Morón, 1986.

6.1.2 Descripción y biología

Las “gallinas ciegas” presentan variantes en su ciclo de vida, encontrándose de ciclo anual (Figura 1), bianual o trianual, dependiendo de la especie. En el estado de Oaxaca predominan diferentes especies de *Phyllophaga*. Los adultos aparecen en los meses de mayo, junio y julio, son de hábitos nocturnos, por lo que en las noches se les observa apareándose y alimentándose del follaje o volando alrededor de lámparas luminosas (SARH, 1988).

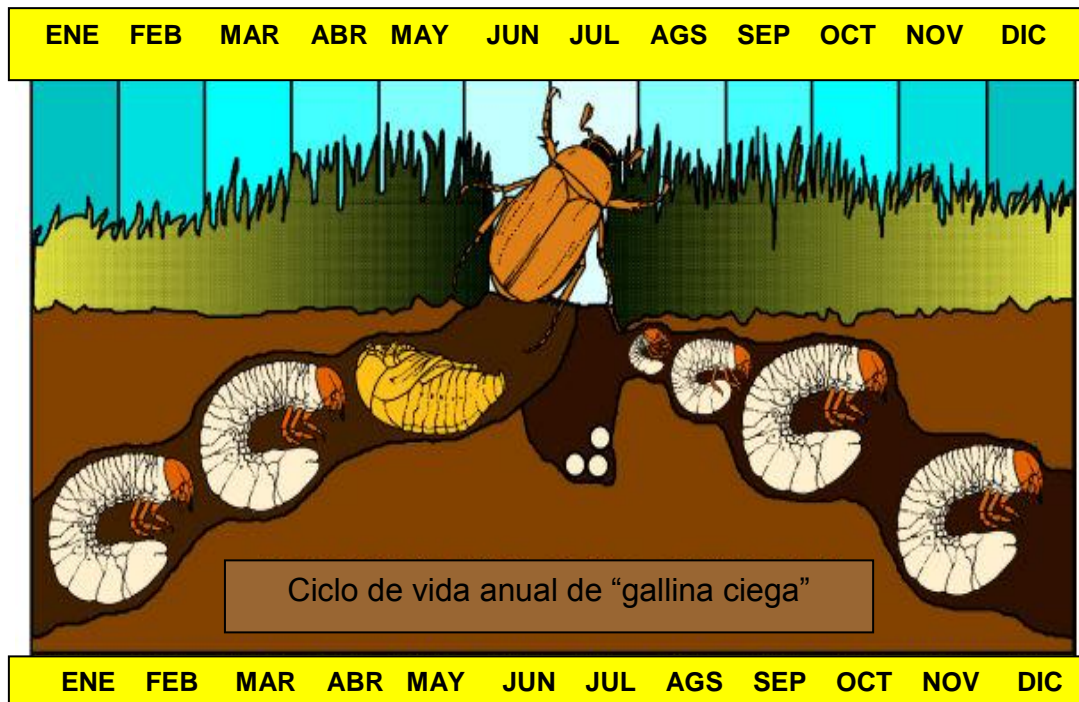


Figura 1. Ciclo de vida anual de “gallina ciega” (*Phyllophaga* sp)
(Tomado de Entomology, 2000)

Al amanecer regresan al suelo, donde las hembras ponen sus huevecillos, que son esféricos, de color blanco aperlado (Figura 2), con un tamaño de 1.5 a 3 mm de diámetro. Éstos son depositados en los suelos húmedos (de siete a 28 huevecillos por insecto), donde permanecen enterrados hasta su eclosión; la incubación dura 15 días, aproximadamente (Metcalf y Flint, 1982).



Figura 2. Huevecillos de *Phyllophaga* sp.

Una vez emergida la larva, inmediatamente empieza a causar daño a las raíces de las plantas (aunque es importante mencionar que algunas especies son saprofitas en sus primeros estadios). El cuerpo de la larva es robusto y curvado (Figura 3), con gran cantidad de pliegues transversales, excepto en la región trasera que es casi lisa y brillante, a través de cuya piel se observa una coloración oscura debido al suelo que ingiere junto con las raíces (SARH, 1988).

La larva de primer estadio es de color blanco cremoso y mide alrededor de 5 mm de largo, la de segundo estadio mide aproximadamente 26 mm y la de tercer estadio oscila entre los 30 a 40 mm. Los gusanos de primer estadio se alimentan de raíces y materia orgánica durante un periodo que varía entre 20 y 60 días hasta aumentar de 10 a 15 veces su peso inicial antes de la ecdisis para el segundo estadio, durante el cual incrementan de cinco a siete veces su biomasa en el transcurso de 30 a 60 días. De esta manera la ecdisis para el tercer estadio larval ocurre entre agosto y octubre dando origen a la fase más longeva y voraz de esta especie, que en las zonas tropicales o subtropicales se alimenta durante cuatro a ocho meses y en las zonas templadas y frías durante siete a 14 meses hasta aumentar de seis a ocho veces su peso antes de iniciar

la etapa de prepupa. En estas zonas las larvas de tercer estadio cesan de alimentarse y se inactivan durante parte del otoño y el invierno profundizando hasta 30-40 cm en el suelo para protegerse de las bajas temperaturas y la sequedad (Morón, 1986). En la primavera suben a la superficie del suelo para alimentarse y completar su desarrollo (Metcalf y Flint, 1982).



Figura 3. Larva, pupas y adulto de *Phyllophaga* sp.

El estado larvario dura alrededor de nueve meses o más según la especie (SARH, 1988). Durante la primavera las larvas de tercer estadio delimitan una celda o cámara ovoide, compactando con sus excrementos las partículas del

suelo a una profundidad de 15 a 20 cm, en la cual expulsan todo el contenido del aparato digestivo y se inmovilizan como prepupa durante una o dos semanas antes de la ecdisis que da origen a la pupa exarada. El color de la pupa es blanco cremoso (Figura 3), amarillo o marrón. La etapa de pupa dura de tres a seis semanas al cabo de la cual emerge el adulto. (Morón, 1986). El imago permanece dentro de la celda en tanto madura su aparato reproductor y se incrementan la humedad y la temperatura para realizar sus primeras actividades en el exterior. La longevidad de los adultos varía entre ocho y 30 días aún cuando las hembras de algunas especies pueden sobrevivir más de dos meses. Los adultos son conocidos comúnmente como escarabajos, presentan un color brillante rojizo- marrón (Figura 3) a negro, miden de 19 a 26 mm de largo, con cuerpo ovalado y robusto (Morón, 1986).

6.1.3 Daños causados

La gallina ciega se encuentra entre los insectos del suelo más destructores y problemáticos. Los adultos son una plaga importante que ataca el follaje de numerosas plantas frutales, forrajeras y de ornato, alimentándose también de flores, néctar y polen. Las larvas tienen aún mayor importancia económica, puesto que se alimentan de numerosas especies de plantas, causando su deterioro en grandes áreas. Entre los muchos ejemplos de cultivos afectados están los pastos, rosales, plántulas de vivero, fresa, maíz, camote, durazno, manzano, betabel y espinaca (Morón, 1986). Afecta también a otros cultivos de importancia económica como frijol, sorgo, trigo, jitomate y chile (Saunders, 1998). Se ha reportado como plaga en café (González, 1989) y en la caña de azúcar (Wilson, 1969). Cuando se siembran con maíz los campos infestados con gallina ciega, generalmente brotan las plantas pero dejan de crecer después de alcanzar una altura de 20 a 60 cm. El maíz mostrará un crecimiento poco uniforme con áreas de tamaño variable, donde las plantas están muertas o secándose, debido a que las larvas se alimentan de las raíces (Metcalf y Flint, 1982). Las plantas de maíz presentan amarillamiento de las hojas, retraso en el crecimiento y pérdida de vigor; además, las heridas producidas en la raíz son vías de entrada de diversos microorganismos causantes de enfermedades (SARH, 1988).

En los Valles Centrales de Oaxaca se cultivan anualmente unas 110,000 hectáreas de maíz, siendo la “gallina ciega” una de las principales plagas del suelo en este cultivo. El daño se presenta en manchones desde las etapas tempranas de desarrollo, adquiriendo las plantas coloraciones violetas debido a la deficiencia inducida de fósforo por daño radicular y mostrando poco vigor y marchites (Ruiz *et al.*, 1998). La mayoría de los campesinos producen para autoconsumo, por lo que deben buscarse alternativas de control de bajo costo y ambientalmente inocuas. El control biológico de la plaga a base de nematodos y hongos entomopatógenos es una alternativa al uso de insecticidas sintéticos (Ruiz *et al.*, 2000).

En los Valles Centrales de Oaxaca, Ruiz *et al.* (1998) aislaron dos cepas de nematodos entomopatógenos de los géneros *Heterorhabditis* y *Steinernema*, concluyendo que tienen potencial para el control de “gallina ciega”.

6.2 Alternativas para el control de plagas

El desarrollo de resistencia de los insectos a los plaguicidas ha estimulado el interés de usar medios biológicos para reducir las poblaciones de plagas. A partir de la década de los años 1980, se reconoce el potencial de los nematodos entomopatógenos para el control microbiano, similar al de las bacterias, virus, protozoarios y hongos (Aguirre y Salazar, 1999).

6.2.1 Nematodos entomopatógenos

Entre las alternativas de manejo de plagas más amigables con el ambiente se cuenta hoy en día con los agentes entomopatógenos, es decir, microorganismos que causan enfermedades a los insectos, como son las bacterias, hongos, virus y nematodos; siendo los nematodos los organismos que en la última década han cobrado gran importancia por su facilidad para ser aplicados en el suelo, su alta virulencia y patogenicidad y su relativa facilidad para ser multiplicados en forma masiva y comercializados (Larriva, 2002).

6.2.1.1 Taxonomía de los nematodos entomopatógenos

Los nematodos se encuentran ubicados en el Phylum Nematoda, el cual se subdivide en las clases Secernentia y Adenophoria (Poinar, 1975, 1990). Los nematodos entomopatógenos conocidos, o bien los que tienen posibilidades de control biológico se encuentran en cuatro órdenes, por importancia, Rhabditida, Mermitida, Tylenchida y Aphelenchida (Smart y Nguyen, 1994).

Dentro del orden Rhabditida se encuentra la mayoría de nematodos de vida libre incluyendo a las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae, parásitos facultativos de insectos (Tanada y Kaya, 1993). La familia Steinernematidae comprende dos géneros; *Steinernema* Travassos, 1927 (Hominick *et al.*, 1997) y *Neosteinernema* Smart y Nguyen, 1994 (Smart y Nguyen, 1994). La familia Heterorhabditidae comprende el género *Heterorhabditis*.

6.2.1.2 Morfología

Los nematodos son definidos generalmente como gusanos invertebrados que poseen un cuerpo no segmentado, con un tracto digestivo completo. Por “tracto digestivo completo” se entiende una boca, un canal alimenticio y un ano (Gaugler, 1999). No tienen una respiración o sistema circulatorio especializado, sin embargo, poseen sistemas nervioso y excretor bien desarrollados y un juego de músculos longitudinales (Georgis, 1991).

6.2.1.3 Comportamiento

Algunas especies de nematodos prefieren buscar sus hospederos cerca de la superficie del suelo, por ejemplo, *S. carpocapsae*, pero otras se han adaptado para buscar en perfiles más profundos del suelo, como *H. bacteriophora* (Kaya y Gaugler, 1993). Una vez que el hábitat ha sido seleccionado, los nematodos entomopatógenos pueden adoptar una de las dos estrategias de búsqueda: a) emboscar a su presa; b) movilizarse hacia su presa (Kaya y Gaugler, 1993).

En el primer caso se trata por lo tanto de nematodos poco móviles y que ahorran energía mientras esperan que su presa venga hacia ellas, sin embargo, presentan el inconveniente de no seguir a su hospedero cuando éste se encuentra en un estado de desarrollo inmóvil, como en el caso de la pupa, de ahí que la única posibilidad para que se ponga en contacto con el insecto es cuando éste pasa cerca de él o se alimenta de algún sustrato en el cual se encuentra presente (Kaya y Gaugler, 1993). En cambio, los nematodos que buscan a su presa son altamente móviles y responden fuertemente a los estímulos químicos emitidos por el hospedero, funcionando éstos como atractivos; estas especies estarían mejor adaptadas para parasitar hospederos subterráneos sedentarios (Kaya y Gaugler, 1993).

Al respecto, Cui *et al.* (1993) mencionan que los juveniles de *S. glaseri* y *H. bacteriophora* son altamente móviles y buscan activamente a los hospederos, siendo más eficaces contra presas subterráneas sedentarias (Gaugler *et al.*, 1989). En contraste, los juveniles de *S. carpocapsae* parecen tener una estrategia emboscadora (posarse y esperar) y son más efectivos contra presas móviles que habitan la superficie (Kaya y Gaugler, 1993). Sin embargo, estas especies acechadoras tendrán más dificultad en localizar los hospederos, principalmente a los sedentarios, tales como los gusanos blancos (Lewis *et al.*, 1992). Mientras que *S. feltiae* presenta características intermedias, entre buscadores y emboscadores, es decir, comparte características con ambos grupos (Grewal *et al.*, 1994).

6.2.1.4 Ciclo biológico

Tanto los steinernemátidos como los heterorhabdítidos tienen un ciclo de vida similar (Figura 4). El ciclo biológico de los nematodos y la bacteria simbiote inicia cuando los nematodos juveniles infectivos (que no se alimentan) emergen del cuerpo de su hospedero (insecto) para localizar otro hospedero susceptible e iniciar una nueva infección. Los nematodos con capacidad de búsqueda se guían por las emisiones de CO₂ del hospedero, mientras que los que tienen una reducida capacidad de desplazamiento se ubican en sitios por los que puede pasar la presa para “emboscarla”. Cuando el futuro hospedero ha sido

localizado, el nematodo se adhiere a él y después penetra en el hemocele del insecto; lo que hace usualmente por las aberturas naturales del cuerpo como la boca, el ano, los espiráculos, así como por las partes delgadas de su cutícula. Los géneros de bacterias asociados con los nematodos son *Xenorhabdus* en el caso de los steinernemátidos y *Photorhabdus* en heterorhabdítidos (Akhurst, 1980).

Una vez en el hemocele (cavidad interior del cuerpo del insecto); la bacteria es liberada desde el intestino del nematodo, misma que se multiplica rápidamente causando primero una disminución en la actividad de la larva, incluyendo la de alimentarse de la planta, y posteriormente la muerte del hospedero en poco tiempo (24 a 96 horas) debido a una septicemia generalizada; el nematodo se alimenta después de los desechos del cuerpo del insecto, ingiriendo también las células bacterianas; alcanzando allí su estado maduro (Gaugler, 1999). Los estados juveniles infectivos de los steinernemátidos pueden llegar a ser machos o hembras, a diferencia de los heterorhabdítidos que se desarrollan en el interior como hermafroditas; no obstante, la subsiguiente generación dentro de un hospedero produce machos y hembras; el ciclo biológico es completado en pocos días y cientos de miles de nuevos juveniles infectivos emergen del cadáver del hospedero (Kaya y Gaugler, 1993). Cuando los nematodos infectivos juveniles (IJ) salen del hospedero, se mueven dentro del suelo buscando una nueva presa para infectarla. La textura, humedad y temperatura de éste afectan su dispersión e infectividad (Marh, 2001).



Figura 4. Ciclo de vida de los nematodos entomopatógenos (Tomado de Dirt Works, 2001) .

1. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Muestreo de suelos

Se llevó a cabo un muestreo de suelos en trece comunidades de la región de Los Valles Centrales de Oaxaca (ver anexo 1) para detectar y aislar posibles especies de nematodos entomopatógenos.

El periodo de muestreo fue en los meses de julio-agosto, que fue cuando se tuvo plenamente establecido el cultivo de maíz, y coincidió con la aparición de los primeros estadios de la gallina ciega y por consiguiente, por lo menos teóricamente, la presencia de nematodos.

Se muestrearon 55 sitios, los factores que guiaron la localización del sitio fueron: cultivo de maíz y presencia de gallina ciega en ciclos de cultivo anteriores -de acuerdo con el conocimiento de los productores-, y síntomas visibles en el cultivo que indicaran la posible presencia de la plaga de gallina ciega (método opinático o intencional de Azorín, 1972).

De manera natural, en el medio en donde existe determinada plaga, existe también su enemigo natural, es por ello que en el muestreo se consideró como un factor guía la presencia de la plaga de gallina ciega en los cultivos de maíz. Un sitio correspondió a una parcela de maíz, en cada sitio se tomaron tres muestras distribuyéndolas espacialmente en tres bolillo, a lo largo de la parcela.

La muestra (1 kg de suelo aproximadamente) se tomó a 10 cm de la base del tallo de la milpa, utilizando una pala recta, a una profundidad entre 10 y 30 cm, se depositó en una bolsa de plástico para evitar la pérdida de humedad, colocándola enseguida en la sombra para que no se elevara su temperatura, lo que afectaría al nematodo en caso de estar presente en la muestra. La pala se lavó con agua después de la toma de cada muestra para evitar la mezcla de posibles nematodos entre muestras.

Una vez en el laboratorio, cada muestra de suelo fue depositada en una charola de plástico de 20x15x7 cm debidamente etiquetada, colocándole a diferentes profundidades cinco larvas de *Galleria mellonella*, bajo una distribución “cinco de oros”, una vez introducidas las larvas, la charola se cubrió con papel aluminio para evitar que se perdiera rápidamente la humedad, haciéndole pequeños orificios al aluminio para permitir el intercambio gaseoso.

Cada dos días durante un periodo de dos semanas, se revisaron las charolas para determinar si existían larvas muertas, si era el caso, éstas se colocaban en trampas White y se les daba seguimiento, si existía emergencia de nematodos, éstos se cosechaban y se almacenaban en frascos de cultivo debidamente etiquetados a una temperatura de refrigeración entre 8 y 12 grados centígrados. Si no había emergencia, la larva se diseccionaba para determinar la presencia de nematodos en su interior.

7.2 Experimento 1.- Selección de cinco biotipos por mortalidad causada a *Galleria mellonella*

A nivel laboratorio se estableció un experimento para seleccionar de los biotipos aislados en el muestreo de suelos, los cinco que causaran el mayor porcentaje de mortalidad a larvas de *Galleria mellonella*.

Procedimiento experimental:

En cajas de petri con papel filtro en el fondo se colocaron 10 larvas de *Galleria mellonella*, en éstas se inocularon los biotipos aislados de las muestras de campo, considerándose cuatro cajas de petri por cada biotipo. Diariamente se añadió a cada una de las cajas de petri 200 microlitros de agua destilada para evitar la muerte del nematodo por falta de humedad. A los cinco días se revisaron las cajas de petri para determinar porcentaje de mortalidad de las larvas, promediándose la mortalidad de las cuatro cajas de petri para cada biotipo.

Una vez que se determinó el porcentaje de mortalidad, se procedió a colocar las larvas muertas en trampas White para que emergieran los nematodos.

La emergencia de nematodos fue un factor que corroboró la muerte de la larva por causa de éstos.

En este experimento se seleccionaron los cinco mejores biotipos en cuanto a porcentaje de mortalidad causado en *Galleria mellonella*, para evaluarlos posteriormente con *Tenebrio molitor* y *Phyllophaga vetula*.

7.3 Experimento 2.- Evaluación de los cinco biotipos por mortalidad causada a *Tenebrio molitor*

Los cinco biotipos sobresalientes en el experimento uno, se evaluaron en laboratorio en cuanto a porcentaje de mortalidad causada a *Tenebrio molitor*, dosis y tiempos letales.

El experimento se estableció bajo un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial $5 \times 5 + 1 = 26$.

Factores: biotipos y dosis de aplicación de nematodos.

Niveles: cinco biotipos seleccionados en el experimento uno y cinco dosis de aplicación de nematodos (50, 100, 200, 500 y 1000 nematodos por larva).

Un testigo con fines de comparación (el testigo tuvo larva de *Tenebrio molitor* pero no se le aplicaron nematodos)

26 tratamientos.

Se utilizó como hospedero a la larva de *Tenebrio molitor*.

La unidad experimental estuvo constituida por 10 vasos de plástico de 100 mL, conteniendo 200 g de suelo esterilizado.

Se establecieron cuatro repeticiones.

Variable respuesta: porcentaje de mortalidad de larvas de *Tenebrio molitor*.

Se determinaron las dosis y tiempos letales para causar el 50 y 95% de mortalidad en las larvas de *Tenebrio molitor*.

En la etapa de análisis de resultados se realizó la normalización de los datos expresados como porcentaje, con el procedimiento raíz cuadrada y arcoseno, para posteriormente proceder con los análisis de varianza y de separación de medias, este último con la prueba de Tukey, con un $\alpha = 0.05$ (SAS, 1988). Con el análisis Probit (SAS, 1988), se determinaron las dosis y tiempos letales para causar el 50 y 95% de mortalidad en las larvas de *Tenebrio molitor*.

Procedimiento experimental:

Los vasos de plástico de 100 mL de capacidad, se llenaron con 200 g de suelo que previamente había sido esterilizado durante dos horas en una autoclave para eliminar la influencia de otros microorganismos patógenos en el desarrollo del experimento. Se agregó agua para alcanzar la humedad deseada (-0.60 MPa), posteriormente se colocó una larva de *Tenebrio molitor* en la superficie del suelo de cada vaso, enseguida se aplicaron los nematodos en suspensión acuosa en cinco diferentes dosis. Con el fin de evitar una pérdida rápida de humedad en los vasos, se cubrieron con papel aluminio al que se le hicieron pequeñas perforaciones con un palillo para permitir el paso de oxígeno. Cada tres días se ajustó la humedad a las condiciones iniciales.

Cada dos días, durante dieciséis días, se revisaron los vasos para determinar el número de larvas muertas, las cuales se pusieron en una trampa White para la emergencia de los nematodos del cadáver de la larva, lo cual confirmó la muerte por infección de nematodos; cuando no hubo emergencia, se diseccionaron las larvas para determinar si en su interior había nematodos y corroborar por lo tanto que la muerte de la larva había sido por causa de éstos. Con los datos correspondientes al día diez después de iniciado el experimento se determinó la dosis letal, mientras que con todos los datos recabados durante el mes se determinó el tiempo letal, ambos indicadores se establecieron para cada uno de los biotipos de nematodos seleccionados previamente en el experimento 1 y para el 50% y 95% de mortalidad de *Tenebrio molitor*.

7.4 Experimento 3.- Evaluación de los cinco biotipos por mortalidad causada a *Phyllophaga vetula*

Los cinco biotipos sobresalientes en el experimento uno, se evaluaron en laboratorio en cuanto a porcentaje de mortalidad causada a *Phyllophaga vetula*, dosis y tiempos letales.

El experimento se estableció bajo un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial $5 \times 5 + 1 = 26$.

Factores: biotipos y dosis de aplicación de nematodos.

Niveles: cinco biotipos seleccionados en el experimento uno y cinco dosis de aplicación de nematodos (50, 100, 200, 500 y 1000 nematodos por larva).

Un testigo con fines de comparación (el testigo tuvo larva de *Phyllophaga vetula* pero no se le aplicaron nematodos)

26 tratamientos.

Se utilizó como hospedero a la larva de *Phyllophaga vetula*.

La unidad experimental estuvo constituida por 10 vasos de plástico de 100 mL, conteniendo 200 g de suelo esterilizado.

Se establecieron cuatro repeticiones.

Variable respuesta: porcentaje de mortalidad de larvas de *Phyllophaga vetula*.

Se determinaron las dosis y tiempos letales para causar el 50 y 95% de mortalidad en las larvas de *Phyllophaga vetula*.

En la etapa de análisis de resultados se realizó la normalización de los datos expresados como porcentaje, con el procedimiento raíz cuadrada y arcoseno, para posteriormente proceder con los análisis de varianza y de separación de medias, este último con la prueba de Tukey, con un $\alpha = 0.05$ (SAS, 1988). Con el análisis Probit (SAS, 1988), se determinaron las dosis y tiempos letales para causar el 50 y 95% de mortalidad en las larvas de *Phyllophaga vetula*.

Procedimiento experimental:

Los vasos de plástico de 100 mL de capacidad, se llenaron con 200 g de suelo que previamente había sido esterilizado durante dos horas en una autoclave para eliminar la influencia de otros microorganismos patógenos en el desarrollo del experimento. Se agregó agua para alcanzar la humedad deseada (-0.60 MPa), posteriormente se colocó una larva de *Phyllophaga vetula* en la superficie del suelo de cada vaso, enseguida se aplicaron los nematodos en suspensión acuosa en cinco diferentes dosis. Con el fin de evitar una pérdida rápida de humedad en los vasos, se cubrieron con papel aluminio al que se le hicieron pequeñas perforaciones con un palillo para permitir el paso de oxígeno. Cada tres días se ajustó la humedad a las condiciones iniciales.

Cada dos días, durante dieciséis días, se revisaron los vasos para determinar el número de larvas muertas, las cuales se pusieron en una trampa White para la emergencia de los nematodos del cadáver de la larva, lo cual confirmó la muerte por infección de nematodos; cuando no hubo emergencia, se diseccionaron las larvas para determinar si en su interior había nematodos y corroborar por lo tanto que la muerte de la larva había sido por causa de éstos. Con los datos correspondientes al día diez después de iniciado el experimento se determinó la dosis letal, mientras que con todos los datos recabados durante el mes se determinó el tiempo letal, ambos indicadores se establecieron para cada uno de los biotipos de nematodos seleccionados en el experimento 1 y para el 50% y 95% de mortalidad de gallina ciega.

7.5 Experimento 4.- Evaluación de los cinco biotipos en tres formulaciones y dos humedades

Los cinco biotipos seleccionados en el experimento uno, se evaluaron en laboratorio aplicándolos en tres formulaciones y dos niveles de humedad para el control de gallina ciega.

El experimento se estableció bajo un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial $5 \times 3 \times 2 + 2 = 32$.

Factores: biotipos, formulaciones y niveles de humedad.

Niveles: cinco biotipos seleccionados en el experimento uno, tres formulaciones de nematodos (*pellets* de arcilla, cadáver infectado de larva de *Tenebrio molitor* y aplicación en medio acuoso) y dos niveles de humedad: moderada (-0.60 MPa) y alta (-0.08 MPa).

Dos testigos a los cuales se les depositó larva de *Phyllophaga vetula* pero no se les aplicó nematodos, uno con humedad moderada y otro con humedad alta. 32 tratamientos.

Se utilizó como hospedero a la larva de *Phyllophaga vetula*.

La unidad experimental estuvo constituida por 10 vasos de plástico de 100 mL, conteniendo 200 g de suelo esterilizado.

Se establecieron cuatro repeticiones.

Variable respuesta: porcentaje de mortalidad de larvas de *Phyllophaga vetula*.

En la etapa de análisis de resultados se realizó la normalización de los datos expresados como porcentaje, con el procedimiento raíz cuadrada y arcoseno, para posteriormente proceder con los análisis de varianza y de separación de medias, este último con la prueba de Tukey, con un $\alpha = 0.05$ (SAS, 1988).

Procedimiento experimental:

A los vasos de plástico de 100 mL, se les agregó 200 g de suelo que previamente había sido esterilizado durante dos horas en autoclave para eliminar la influencia de otros microorganismos patógenos en el desarrollo del experimento. Se agregó agua para alcanzar las dos condiciones de humedad (alta y moderada).

Con el objeto de presentar las dos condiciones de humedad (alta y moderada) en unidades universales, se hizo uso de la curva de humedad presentada por Hamblin, (1981); la cual presenta en el eje de las abscisas los porcentajes de contenido de humedad y en el eje de las ordenadas la tensión del agua expresada en MPa; de tal manera que al interceptar en la curva la humedad alta (20.5% de humedad) correspondió a -0.08 MPa en el eje de las ordenadas,

mientras que la humedad moderada (11.8% de humedad) correspondió a -0.6 MPa.

Se colocó una larva de gallina ciega en la superficie del suelo de cada vaso, si después de 30 minutos la larva no se introducía en el suelo, se reemplazaba por otra, para asegurar con ello que estuviera en buenas condiciones. Enseguida se sembró en cada vaso una semilla de maíz para que al germinar sirviera de alimento a la larva. Con el fin de evitar una rápida pérdida de humedad en los vasos, se cubrieron con papel aluminio al que se le hicieron pequeñas perforaciones con un palillo para permitir el paso de oxígeno. Cada tres días se ajustó la humedad a las condiciones iniciales. Al día siguiente de colocadas las larvas de gallina ciega, se aplicaron los nematodos en sus tres formulaciones (*pellet*, cadáver y medio acuoso), la dosis aplicada fue en el caso de *pellet* de arcilla uno por vaso, en el caso de cadáver infectado uno por vaso y en el caso de aplicación en medio acuoso 1000 nematodos por vaso.

Diez días después de aplicados los tratamientos de nematodos, las gallinas ciegas fueron extraídas de los vasos y contadas como vivas o muertas. Las muertas fueron puestas en trampa White para la emergencia de los nematodos infectivos juveniles, lo cual confirmó la muerte de la larva por efecto de éstos, cuando no hubo emergencia, se diseccionaron las larvas para corroborar que efectivamente las larvas hubieran muerto por acción de los nematodos, en cuyo caso éstos se encontraban en el interior de la larva.

7.6 Experimento 5.- Evaluación de la vida de anaquel de los cinco biotipos en tres formulaciones

Experimento de laboratorio para evaluar la vida de anaquel (porcentaje de sobrevivencia) de los cinco biotipos sobresalientes en el experimento uno, bajo las formulaciones cadáver infectado, *pellet* de arcilla y aplicación en medio acuoso, almacenadas a temperatura ambiente por 0.5, 1, 2 y 3 meses.

El experimento se estableció bajo un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial $5 \times 3 = 15$.

Factores: biotipos y formulaciones.

Niveles: cinco biotipos seleccionados en el experimento uno, tres formulaciones de nematodos (*pellets* de arcilla, cadáver infectado de larva de *Galleria mellonella* y aplicación en medio acuoso)

15 tratamientos.

Se utilizó como hospedero a la larva de *Galleria mellonella*.

La unidad experimental estuvo constituida por 16 cajas de petri, conteniendo la formulación correspondiente.

Se establecieron cuatro repeticiones.

Variable respuesta: porcentaje de sobrevivencia de los nematodos a los 0.5, 1, 2 y 3 meses.

En la etapa de análisis de resultados se realizó la normalización de los datos expresados como porcentaje, con el procedimiento raíz cuadrada y arcoseno, para posteriormente proceder con los análisis de varianza y de separación de medias, este último con la prueba de Tukey, con un $\alpha = 0.05$ (SAS, 1988).

7.7 Experimento 6.- Evaluación de tres biotipos en experimento semicontrolado

Los tres biotipos de nematodos entomopatógenos mas sobresalientes en laboratorio (por causar la mayor mortalidad a *Phyllophaga vetula* y presentar las menores dosis y tiempos letales) se evaluaron en campo en un experimento semicontrolado, aplicándose en tres formulaciones para el control de *Phyllophaga vetula*

El experimento se estableció bajo un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial $3 \times 3 + 1 = 10$.

Factores: biotipos y formulaciones.

Niveles: tres biotipos seleccionados en laboratorio (por causar la mayor mortalidad a *Phyllophaga vetula* y presentar las menores dosis y tiempos letales) y tres formulaciones de nematodos (*pellets* de arcilla, cadáver infectado de larva de *Galleria mellonella* y aplicación en medio acuoso).

Un testigo al cual se le depositó larva de *Phyllophaga vetula* pero no se le aplicaron nematodos.

Se utilizó como hospedero a la larva de *Phyllophaga vetula*.

La unidad experimental estuvo constituida por una bolsa de plástico de 15 litros de capacidad conteniendo suelo esterilizado, a la que se le depositaron cinco larvas de *Phyllophaga vetula*.

Se establecieron cuatro repeticiones.

Variable respuesta: porcentaje de mortalidad de larvas de *Phyllophaga vetula*.

En la etapa de análisis de resultados se realizó la normalización de los datos expresados como porcentaje, con el procedimiento raíz cuadrada y arcoseno, para posteriormente proceder con los análisis de varianza y de separación de medias, este último con la prueba de Tukey, con un $\alpha = 0.05$ (SAS, 1988).

Procedimiento experimental:

Se establecieron plantas de maíz en bolsas de 15 litros de capacidad llenas con suelo esterilizado, a las cuales se les adicionó cinco larvas de *Phyllophaga vetula* cuando la planta de maíz tenía cinco hojas (V5). Una semana después, se aplicaron los nematodos en las diferentes formulaciones, evaluando tres semanas después los porcentajes de mortalidad de *Phyllophaga vetula*. Se estableció un testigo que contuvo larvas, pero no se le aplicaron nematodos.

Para la evaluación de la persistencia de los nematodos entomopatógenos, se utilizaron las bolsas del experimento semicontrolado, a las cuales después de un riego ligero, se les aflojó el suelo y se les depositaron 10 galerías por bolsa para la recaptura de los nematodos sobrevivientes a los 2, 4 y 6 meses de aplicados.

7.8 Identificación de biotipos

Los cinco biotipos de nematodos entomopatógenos que resultaron más efectivos para el control de *Phyllophaga vetula* fueron identificados por técnicas de PCR (polymerase chain reaction) en el Laboratorio de Nematology de la University of California, Davis, aplicando el procedimiento creado por Ellis *et al.*, (1986); Zhou *et al.*, (1998) el cual se describe enseguida.

Extracción de DNA. Se obtuvieron nematodos adultos a partir de la disección de cadáveres infectados de *G. mellonella*, los cuales fueron cortados a la mitad y depositados en una mezcla de 20 µl de resina 'Chelex 100' (5%, Bio-Rad, Hercules, CA) y 1 µl de solución de proteinasa K (20 mg/ml; Sigma, St. Louis, Missouri). La mezcla se incubó a 56°C por 1 h, después a 100°C por 8 min, y enfriada a 40°C por 30 s. Después de agitarla mecánicamente por 30 s, las muestras se almacenaron a -17°C. En algunos casos no se encontraron nematodos adultos, por lo cual se utilizaron los IJ disponibles.

Condiciones de la PCR. Las regiones ITS-1 y ITS-2 del DNA ribosomal fueron amplificadas usando los "primers" 18S y 28S (no. 93, 5' TTGAACCGGGTAAAAGTCG y no. 94, 5'TTAGTTTCTTTTCTCCGCT) diseñados por Nadler *et al.* (2000). La amplificación de la PCR se realizó en un volumen de reacción de 25 µl, conteniendo 2.5 µl de 10xPCR-buffer, 14.6 µl de H₂O, 3 µl de MgCl₂ (25mM), 0.5 µl de dNTPs (10 mM), 0.4 µl de Taq polymerase (5 units/µl, Gene choice T-18), 1.25 µl of Primer Forward (10 µM), 1.25 µl de Primer Reverse (10 µM), y 1.5 µl de DNA. Todas las reacciones de la PCR se realizaron en un termociclador marca Applied Biosystems 2720 con un perfil de: 1 ciclo a 94°C por 2 min, seguido por 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 60 °C por 30 y 72 °C por 50 s. El último paso fue una extensión post-amplificación a 72°C por 4 min.

Secuenciación. Los productos amplificados fueron purificados por medio de un tratamiento enzimático con la exonucleasa I y fosfatasa alcalina de camarón (PCR product pre-sequencing kit, USB Corporation). Los "primers" usados para

secuenciar fueron los mismos usados para la PCR. Los “Contigs” fueron ensamblados usando el “Codon Code Aligner” (ver. 3.6.1) y una búsqueda BLAST realizada en secuencia consensada final. Solo las coincidencias (“matches”) arriba del 99% de identidad se consideraron positivas (Stock *et al.*, 2001).

7.9 Análisis de correlación y regresiones

Se determinó la correlación existente entre la presencia de nematodos entomopatógenos en las muestras de suelo y los factores pH y porcentajes de materia orgánica, arena, arcilla y limo.

Se seleccionaron las 10 muestras de suelo de donde se aislaron los biotipos de nematodos entomopatógenos que causaron el mayor porcentaje de mortalidad a las larvas de *Galleria mellonella* en el experimento uno, se les colocaron 10 larvas de *Galleria Mellonella*, después de cinco días se determinó el porcentaje de larvas muertas, las cuales se colocaron en trampas White, para corroborar su muerte por nematodos.

Para determinar pH, y porcentajes de materia orgánica, arena arcilla y limo las 10 muestras seleccionadas se analizaron en el laboratorio de suelos del CIIDIR IPN Oax.

Para determinar la correlación existente entre los factores mencionados y la presencia de nematodos en el suelo, se hizo uso de la prueba de correlación de Pearson (SAS, 1988), posteriormente se hicieron análisis de regresión lineal, exponencial, logarítmica, polinómica y potencial entre el porcentaje de mortalidad de larvas y cada uno de los factores edáficos mencionados para determinar el modelo de predicción de la existencia de nematodos en el suelo que presentara la mayor R^2 .

8. RESULTADOS

8.1 Muestreo de suelos

En el Anexo 1 se muestran los resultados del muestreo de suelos realizado en los Valles Centrales de Oaxaca, con fines de localizar y aislar especies nativas de nematodos entomopatógenos.

Las columnas que posee el anexo mencionado son: número de muestra, lugar, paraje, cultivo, género probable (en este apartado se menciona el género probable de nematodo, este se definió de acuerdo a la coloración de la larva después de haber sido muerta por nematodos, ya que el género *Heterorhabditis* produce una coloración roja, mientras que el *Steinernema* produce una coloración negra, o bien mantiene el color original de la larva) y finalmente una columna en donde se menciona si hubo o no presencia de nematodos.

De las 55 muestras colectadas (Anexo 1), 27 resultaron aparentemente positivas, es decir, en éstas se encontraron nematodos, lo cual representó un 49% del total. De las 27 muestras aparentemente positivas (de acuerdo con la coloración adquirida por la larva), 22 fueron infectadas por el género *Steinernema* (81%) y cinco por *Heterorhabditis* (19%).

Sin embargo, no en todas las muestras infectadas, la emergencia de nematodos fue adecuada, presentándose sobre todo la invasión de la larva por hongos, lo cual evitó la emergencia.

De las 27 muestras infectadas, sólo en 16 se dio una emergencia adecuada de nematodos, 11 muestras correspondieron a *Steinernema* y cinco muestras a *Heterorhabditis*; lo que equivale a 69% y 31% respectivamente.

Fue clara la predominancia que presentó el género *Steinernema* comparado con *Heterorhabditis*.

8.2 Experimento 1.- Selección de cinco biotipos por mortalidad causada a *Galleria mellonella*

Los 16 biotipos de nematodos entomopatógenos obtenidos de las muestras de campo se sometieron a este experimento; los resultados se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1.- Mortalidad de *Galleria mellonella* causada por los biotipos de nematodos entomopatógenos aislados de las muestras de suelo.

No. de muestra	Lugar	Género	Mortalidad Causada a <i>Galleria mellonella</i> (%)
1	Cuilapam	<i>Steinernema</i>	97.5
2	Cuilapam	<i>Steinernema</i>	100
5	Cuilapam	<i>Heterorhabditis</i>	95.0
8	Cuilapam	<i>Heterorhabditis</i>	100
17	Guadalupe, Etlá	<i>Steinernema</i>	67.5
20	CIIDIR	<i>Steinernema</i>	80.0
21	CIIDIR	<i>Steinernema</i>	55.0
24	Lachigoló, Tlacolula	<i>Heterorhabditis</i>	100
25	Sn. Dionisio, Ocotlán	<i>Steinernema</i>	77.5
39	Sta. Cruz Mixtepec	<i>Steinernema</i>	35.0
40	Santa Inés, Ayoquezco	<i>Steinernema</i>	75.0
41	Santa Inés, Ayoquezco	<i>Steinernema</i>	70.0
44	Sn. Pedro Mártir, Ocotlán	<i>Steinernema</i>	40.0
46	Sn. Pedro Mártir, Ocotlán	<i>Heterorhabditis</i>	72.5
47	Los Ocotes, Ejutla	<i>Heterorhabditis</i>	75.0
50	Los Ocotes, Ejutla	<i>Steinernema</i>	75.0

En el Cuadro 2 se muestran los cinco biotipos que causaron mayor mortalidad a *Galleria mellonella*. Cuatro de ellos correspondieron a la comunidad de Cuilapam de Guerrero, dos steinernemátidos y dos heterorhabdítidos y uno de ellos a Lachigoló, Tlacolula (heterorhabdítido).

Cuadro 2.- Biotipos con mayores porcentajes de mortalidad sobre *Galleria mellonella* y su código de denominación.

No. de muestra	Lugar	Género	Mortalidad causada a <i>Galleria mellonella</i> (%)	Código de denominación
1	Cuilapam	<i>Steinernema</i>	97.5	CS1
2	Cuilapam	<i>Steinernema</i>	100	CS2
5	Cuilapam	<i>Heterorhabditis</i>	95.0	CH5
8	Cuilapam	<i>Heterorhabditis</i>	100	CH8
24	Lachigoló, Tlacolula	<i>Heterorhabditis</i>	100	LH24

8.3 Experimento 2.- Evaluación de los cinco biotipos por mortalidad causada a *Tenebrio molitor*

El análisis de varianza para comparar la mortalidad causada en larvas de *Tenebrio molitor* (un insecto menos susceptible a la infección de nematodos entomopatógenos que *G. mellonella*) por los cinco biotipos seleccionados en el experimento uno, aplicados en cinco diferentes dosis se muestra en el Anexo 2.

De acuerdo con la información del análisis de varianza (Anexo 2) se puede decir que existió diferencia estadísticamente significativa en la mortalidad causada a *Tenebrio molitor* en por lo menos un tratamiento con respecto a los demás, dado que se rechazó la hipótesis nula de no significancia al tener un valor de la Prob > F menor a 0.0001. La proporción de variabilidad de la variable dependiente explicada por las variables independientes fue de 96%, valor adecuado al estar cercano al 100%.

Analizando por factores (Anexo 2), se encontró que no existió diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de mortalidad causado a *Tenebrio molitor* por los diferentes biotipos de nematodos, puesto que el valor de Prob > F fue mayor a 0.01, mientras que en el caso de la mortalidad causada por las dosis si existió significancia al presentarse un valor de Prob > F menor a 0.0001.

La comparación de medias entre tratamientos, biotipos de nematodos y dosis de aplicación se presentan en los Cuadros tres, cuatro y cinco, respectivamente.

De acuerdo con los resultados que se muestran en el Cuadro tres, puede notarse que los porcentajes de mortalidad de *T. mollitor* mayores o iguales a 90% ocurrieron significativamente (Tukey, $\alpha = 0.05$) con las mayores dosis (500 a 1000 nematodos por larva).

Cuadro 3.- Comparación de medias de porcentaje de mortalidad de *Tenebrio mollitor* entre tratamientos.

Tratamiento	Biotipo	Dosis (nematodos por larva)	% de mortalidad	
25	LH24	1000	100	a*
10	CS2	1000	100	a
15	CH5	1000	100	a
4	CS1	500	100	a
5	CS1	1000	100	a
20	CH8	1000	100	a
9	CS2	500	97.5	ab
14	CH5	500	95.0	ab
24	LH24	500	90.0	ab
19	CH8	500	87.5	b
3	CS1	200	47.5	c
8	CS2	200	42.5	cd
23	LH24	200	37.5	cde
18	CH8	200	32.5	cde
13	CH5	200	30.0	cdef
22	LH24	100	22.5	cdefg
7	CS2	100	17.5	defgh
2	CS1	100	17.5	defgh
12	CH5	100	17.5	defgh
17	CH8	100	15.0	efgh
11	CH5	50	10.0	fgh
6	CS2	50	7.5	gh
16	CH8	50	7.5	gh
21	LH24	50	5.0	h
1	CS1	50	5.0	h

* Valores con la misma letra en la columna son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha = 0.05$).

El Cuadro cuatro muestra que no existió diferencia estadísticamente significativa (Tukey, $\alpha = 0.05$) entre los porcentajes de mortalidad causados a *Tenebrio mollitor* por los diferentes biotipos de nematodos.

Cuadro 4.- Comparación de medias de porcentaje de mortalidad de *Tenebrio mollitor* entre biotipos.

Biotipo	% de mortalidad	
CS1	54.0	a*
CS2	53.0	a
CH5	50.5	a
CH8	48.5	a
LH24	46.0	a

*Valores con la misma letra en la columna son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha = 0.05$).

El porcentaje de mortalidad causado a *Tenebrio mollitor* presentó diferencia estadísticamente significativa entre todas las dosis de aplicación de nematodos (Cuadro cinco), presentándose los mayores porcentajes de mortalidad en las dosis de 500 y 1000 nematodos por larva, con 94 y 100% de mortalidad, respectivamente.

Cuadro 5.- Comparación de medias de porcentaje de mortalidad de *Tenebrio mollitor* entre dosis.

Dosis (nematodos por larva)	% de mortalidad	
1000	100	a*
500	94.0	b
200	38.0	c
100	18.5	d
50	7.0	e

*Valores con la misma letra en la columna son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha = 0.05$).

8.3.1 Dosis y tiempos letales en *Tenebrio mollitor*

En el Cuadro seis se presentan las dosis y tiempos letales que presentaron cada uno de los cinco biotipos sobresalientes en el experimento uno, aplicados a larvas de *Tenebrio mollitor*.

Cuadro 6.-Dosis (50 y 95) y tiempos letales (50 y 95) para cada uno de los biotipos aplicados a larvas de *Tenebrio molitor*.

Biotipo	Dosis 50	Dosis 95	Tiempo letal 50	Tiempo letal 95
CS1	202	363	2.5	6.7
CS2	230	449	3.0	8.3
CH5	259	516	3.8	8.1
LH24	265	551	4.0	9.7
CH8	290	583	4.1	9.9

La información del Cuadro seis muestra que tanto en dosis como en tiempos letales, los biotipos steinernemátidos (CS1 y CS2) presentaron los menores valores comparados con los heterorhabdítidos (CH5, LH24 y CH8), lo cual implica que los primeros presentaron mayor eficacia para el control de *Tenebrio molitor*.

8.4 Experimento 3.- Evaluación de los cinco biotipos por mortalidad causada a *Phyllophaga vetula*

El análisis de varianza para comparar la mortalidad causada en larvas de *Phyllophaga vetula* (la especie plaga) por los cinco biotipos seleccionados en el experimento uno, aplicados en cinco diferentes dosis se muestra en el Anexo 3.

De acuerdo con la información del análisis de varianza (Anexo 3) se puede decir que existió diferencia estadísticamente significativa en la mortalidad causada a *Phyllophaga vetula* en por lo menos un tratamiento con respecto a los demás, dado que se rechaza la hipótesis nula de no significancia al tener un valor de la Prob > F menor a 0.0001. La proporción de variabilidad de la variable dependiente explicada por las variables independientes fue de 91%, valor adecuado al estar cercano al 100%.

Analizando por factores (Anexo 3), se encontró que no existió diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de mortalidad causado a *Phyllophaga vetula* por los diferentes biotipos de nematodos, puesto que el valor de Prob > F fue mayor a 0.01, mientras que en el caso de la mortalidad

causada por las dosis, si existió significancia al presentarse un valor de Prob > F menor a 0.0001.

La comparación de medias entre tratamientos, biotipos de nematodos y dosis de aplicación se presentan en los Cuadros siete, ocho y nueve, respectivamente.

En el Cuadro siete, se muestra que los porcentajes de mortalidad de *Phyllophaga vetula* mayores o iguales a 95% ocurrieron significativamente (Tukey, $\alpha = 0.05$) con la mayor dosis (1000 nematodos por larva).

Cuadro 7.- Comparación de medias de porcentaje de mortalidad de *Phyllophaga vetula* entre tratamientos.

Tratamiento	Biotipo	Dosis (nematodos por larva)	% de mortalidad	
25	LH24	1000	100	a*
15	CH5	1000	100	a
10	CS2	1000	97.5	ab
20	CH8	1000	97.5	ab
5	CS1	1000	95.0	b
14	CH5	500	90.0	c
24	LH24	500	90.0	c
19	CH8	500	87.5	cd
18	CH8	200	87.5	cd
4	CS1	500	47.5	e
9	CS2	500	47.5	e
13	CH5	200	37.5	f
23	LH24	200	37.5	f
8	CS2	200	32.5	g
3	CS2	100	30.0	g
12	CH5	100	22.5	h
7	CS1	200	17.5	i
22	LH24	100	15.0	ij
21	LH24	50	15.0	ij
17	CH8	100	10.0	k
1	CS1	50	7.5	kl
16	CH8	50	5.0	l
2	CS1	100	5.0	l
11	CH5	50	5.0	l
6	CS2	50	5.0	l

* Valores con la misma letra en la columna son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha = 0.05$).

El Cuadro ocho muestra que la mortalidad causada a *Phyllophaga vetula* fue significativamente diferente, (Tukey, $\alpha = 0.05$), entre los heterorhabdítidos (CH8, LH24 y CH5) y los steinernemátidos (CS2 y CS1), presentando los primeros los mayores porcentajes de mortalidad (51.0 a 57.5%).

Cuadro 8.- Comparación de medias de porcentaje de mortalidad de *Phyllophaga vetula* entre biotipos.

Biotipo	% de mortalidad	
CH8	57.5	a*
LH24	51.5	a
CH5	51.0	a
CS2	42.5	b
CS1	34.5	c

*Valores con la misma letra en la columna son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha = 0.05$).

El Cuadro 9 muestra que el porcentaje de mortalidad causado a *Phyllophaga vetula* presentó diferencia estadísticamente significativa entre las dosis de aplicación de nematodos, a excepción de la de 100 y 50 que se agruparon en un mismo grupo estadístico, la dosis de 1000 nematodos por larva fue la que causó la mayor mortalidad (98.0%).

Cuadro 9.- Comparación de medias de porcentaje de mortalidad de *Phyllophaga vetula* entre dosis.

Dosis (nematodos por larva)	% de mortalidad	
1000	98.0	a*
500	72.5	b
200	42.5	c
100	16.5	d
50	7.5	d

*Valores con la misma letra en la columna son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha = 0.05$).

8.4.1 Dosis y tiempos letales en *Phyllophaga vetula*

El Cuadro 10 muestra las dosis y tiempos letales que presentaron cada uno de los cinco biotipos sobresalientes en el experimento uno, aplicados a larvas de *Phyllophaga vetula*.

Cuadro 10.-Dosis (50 y 95) y tiempos letales (50 y 95) para cada uno de los biotipos de nematodos aplicados a *Phyllophaga vetula*.

Biotipo	Dosis 50	Dosis 95	Tiempo letal 50	Tiempo letal 95
CH8	326	726	3.1	7.1
LH24	339	602	2.7	6.2
CH5	348	613	2.8	6.3
CS2	382	920	4.0	9.8
CS1	405	998	4.1	10.3

De acuerdo con la información que se presenta en el Cuadro 10, se tiene que tanto en dosis como en tiempos letales, los biotipos heterorhabdítidos (CH5, LH24 y CH8) presentaron los menores valores comparados con los, steinernemátidos (CS1 y CS2) lo cual implica que los primeros presentaron mayor eficacia para el control de *Phyllophaga vetula*.

8.5 Experimento 4.- Evaluación de los cinco biotipos de nematodos en tres formulaciones y dos contenidos de humedad

El análisis de varianza para comparar la mortalidad causada en larvas de *Phyllophaga vetula* (la especie plaga) por los cinco biotipos seleccionados en el experimento uno, aplicados en tres formulaciones y dos contenidos de humedad se muestra en el Anexo 4.

El análisis de varianza que se presenta en el Anexo 4 muestra que existió diferencia estadísticamente significativa en la mortalidad causada a *Phyllophaga vetula* en por lo menos un tratamiento con respecto a los demás, dado que se rechaza la hipótesis nula de no significancia al tener un valor de la Prob > F menor a 0.0001. La proporción de variabilidad de la variable dependiente explicada por las variables independientes fue de 86%, de acuerdo con la experiencia acumulada en la experimentación, de manera convencional, valores mayores de 70%, se consideran aceptables.

Analizando por factores (Anexo 4), se encontró que en los tres (nematodo, formulación y humedad) existió diferencia estadística significativa en sus niveles, en cuanto a la mortalidad que generan en *Phyllophaga vetula*, puesto que el valor de Prob > F fue menor a 0.0001 en los tres casos.

La comparación de medias entre tratamientos, biotipos de nematodos, formulaciones y contenidos de humedad se presentan en los Cuadros 11, 12 y 13, respectivamente.

Cuadro 11.- Comparación de medias entre biotipos de nematodos, de acuerdo con la mortalidad causada a *Phyllophaga vetula*.

Biotipo	% de mortalidad
CH8	62.5 a*
LH24	59.6 a
CH5	57.9 a
CS1	42.0 b
CS2	39.6 b

* Valores con la misma letra en la columna son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha = 0.05$).

En el Cuadro 11 puede observarse que existió diferencia estadística significativa en el porcentaje de mortalidad causado a *Phyllophaga vetula* entre heterorhabdítidos (CH8, LH24 y CH5) y steinernemátidos (CS1 y CS2), presentando los primeros los mayores porcentajes de mortalidad sobre *Phyllophaga vetula* (57.9 a 62.5%), es decir, éstos presentaron una mayor eficacia para el control de la plaga. En el experimento dos, en *Tenebrio molitor* fueron los steinernemátidos quienes presentaron mayor eficacia para su control.

Cuadro 12.- Comparación de medias entre formulaciones, de acuerdo con la mortalidad causada a *Phyllophaga vetula*.

Formulación	% de mortalidad
Cadáver	63.3 a*
Medio acuoso	60.7 a
Pellet	34.3 b

* Valores con la misma letra en la columna son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha = 0.05$).

Según la información del Cuadro 12, no existió diferencia estadística significativa en la mortalidad causada a larvas de *P. vetula* entre La formulación en cadáver y aplicación en medio acuoso; siendo estas dos las más eficientes (60.7 a 63.3% de mortalidad) y ambas fueron significativamente diferentes en porcentaje de mortalidad comparadas con la formulación en pellet quien presentó la menor eficacia para el control de *P. vetula* (34.3%).

Cuadro 13.- Comparación de medias entre contenidos de humedad, de acuerdo con la mortalidad causada a *Phyllophaga vetula*.

Contenido de humedad	% de mortalidad
Baja (-0.6 MPa)	61.7 a*
Alta (-0.08 MPa)	43.3 b

*Valores con la misma letra en la columna son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha = 0.05$).

En el Cuadro 13 se muestra que el porcentaje de mortalidad de *P. vetula*, fue significativamente diferente, entre los contenidos de humedad bajo y alto, presentando el primero el mayor valor (61.7%).

De acuerdo con los resultados anteriores se puede establecer que para el caso específico de este experimento, significativamente los mayores porcentajes de mortalidad de *P. vetula*, se obtuvieron con los biotipos del género *Heterorhabditis*, con las formulaciones cadáver y medio acuoso y con humedad baja (- 0.6 MPa).

8.6 Experimento 5.- Evaluación de la vida de anaquel de los cinco biotipos en tres formulaciones

Para la evaluación en laboratorio de la vida de anaquel se consideraron los cinco biotipos de nematodos sobresalientes en el experimento uno: LH24, CH5, CH8, CS1 Y CS2, tres formulaciones: cadáver, medio acuoso y pellet, y se midió para cuatro tiempos: 0.5, 1, 2 y 3 meses, todo esto a temperatura ambiente.

En el Cuadro 14 se muestran los resultados de la evaluación de la vida de anaquel, no se realizó análisis de varianza puesto que a excepción de 0.5 meses, en todas las demás fechas sólo hubo sobrevivencia en medio acuoso, además, en 0.5 meses la diferencia entre medio acuoso y pellet es notoria, mientras que en cadáver no hubo sobrevivencia.

Cuadro 14.- Porcentaje de sobrevivencia de cinco biotipos de nematodos en tres diferentes formulaciones y en cuatro tiempos diferentes.

Biotipo	Formulación	0.5 meses	1mes	2 meses	3 meses
LH24	cadáver	0	0	0	0
LH24	medio acuoso	95	87	48	25
LH24	pellet	2	0	0	0
CH5	cadáver	0	0	0	0
CH5	medio acuoso	97	72	50	22
CH5	pellet	7	0	0	0
CH8	cadáver	0	0	0	0
CH8	medio acuoso	96	83	32	17
CH8	pellet	5	0	0	0
CS1	cadáver	0	0	0	0
CS1	medio acuoso	99	79	43	15
CS1	pellet	12	0	0	0
CS2	cadáver	0	0	0	0
CS2	medio acuoso	97	80	38	23
CS2	pellet	8	0	0	0

Puede observarse en el Cuadro 14, que la única formulación que permitió mantener durante largo tiempo los nematodos a temperatura ambiente, independientemente de la especie de que se tratara fue el medio acuoso. En el caso de pellet a medio mes, la sobrevivencia fue mínima y en fechas posteriores ya no hubo sobrevivencia, esto se debió a que el pellet se secó muy rápidamente y los nematodos murieron. Respecto a la formulación en cadáver no hubo sobrevivencia desde los primeros quince días, esto se debió a que una vez que el alimento se terminó dentro de la larva (a los cinco días en steinernemátidos y a los nueve días en heterorhabdítidos, aproximadamente), los nematodos salieron de ésta y murieron al no encontrar humedad en el exterior. Haciendo referencia a los steinernemátidos tardaron menos en salir de la larva, empezaron a salir de ésta aproximadamente a los cinco días de que fue infectada, fue por ello que a los quince días prácticamente la totalidad

había salido, pero murieron al no encontrar suficiente humedad. Se tuvo la idea de que bañando la larva recién infectada en una solución al 0.05% de grenetina y posteriormente pasándola en arcilla se formaría una capa protectora que impediría que salieran los nematodos y al mismo tiempo evitaría que la larva se secase rápidamente, sin embargo, debido a la rugosidad de la larva, la película de arcilla que se formó no fue homogénea quedando espacios sin cubrir, siendo por ahí donde se salieron los nematodos y donde se perdió humedad más rápidamente. Las tres formulaciones (cadáver, pellet y medio acuoso) se colocaron dentro de cajas de petri, cubriéndolas con su tapa para evitar al máximo la pérdida de agua, pero aún así, ésta fue muy rápida.

8.7 Experimento 6.- Evaluación de tres biotipos de nematodos en experimento semicontrolado en campo

En el Cuadro 15 se presenta la comparación de medias de mortalidad causada a *P. vetula*, en el experimento semicontrolado en campo, considerando las combinaciones resultantes de tres biotipos por tres formulaciones.

Cuadro 15.- Comparación de medias de porcentaje de mortalidad de *P. vetula* entre tratamientos en el experimento 6.

Tratamiento	Biotipo	Formulación	% de mortalidad	
1	LH24	cadáver	96.7	a*
5	CH5	medio acuoso	93.3	a
7	CS2	cadáver	93.3	a
4	CH5	cadáver	90.0	a
2	LH24	medio acuoso	86.6	a
8	CS2	medio acuoso	83.3	a
3	LH24	pellet	16.7	b
6	CH5	pellet	13.3	b
9	CS2	pellet	6.7	b

* Valores con la misma letra en la columna son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha = 0.05$).

Puede observarse en el Cuadro 15, que no existió diferencia estadística significativa en el porcentaje de mortalidad de *P. vetula* obtenida por las formulaciones cadáver y medio acuoso, siendo éstas las que presentaron

mayor eficacia en el control de gallina ciega (más de 80% de mortalidad). La formulación pellet fue significativamente diferente de las dos primeras, siendo poco eficiente para el control de gallina ciega (menos de 20% de mortalidad), agrupándose en un grupo estadístico diferente a las dos anteriores.

En los Cuadros 16 y 17 se presentan los análisis por biotipo y formulación respectivamente.

Cuadro 16.-Porcentaje de mortalidad causada a *P. vetula*, de acuerdo con el biotipo de nematodo utilizado en el experimento semicontrolado de campo.

Biotipo	% de mortalidad
LH24	66.7 a
CH5	65.5 a
CS2	61.1 a

* Valores con la misma letra en la columna son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha = 0.05$).

De acuerdo con la información presentada en el Cuadro 16, no hubo diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de mortalidad causado a *P. vetula* por los biotipos de nematodos utilizados en el experimento semicontrolado, lo cual quiere decir que en el control de la plaga mencionada, para las condiciones estudiadas, cualquiera de ellos presentó los mismos resultados, los porcentajes de mortalidad variaron en los tres biotipos de 61.1 a 66.7%.

Cuadro 17.-Porcentaje de mortalidad causada a *P. vetula*, de acuerdo con el tipo de formulación utilizada en el experimento semicontrolado de campo.

Formulación	% de mortalidad
cadáver	93.3 a
medio acuoso	87.7 a
pellet	12.2 b

* Valores con la misma letra en la columna son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha = 0.05$).

En el Cuadro 17 se establece que no hubo diferencia estadísticamente significativa en los porcentajes de mortalidad de *P. vetula* generados por las

formulaciones cadáver y medio acuoso, siendo éstos los más altos (mayores a 85%); sin embargo, el porcentaje de mortalidad generado por la formulación pellet sí fue significativamente diferente a los dos anteriores, presentando poca eficacia para el control de *P. vetula* (menor a 15% de mortalidad).

8.7.1 Evaluación de persistencia en el experimento semicontrolado

De acuerdo con el diseño del experimento, la persistencia se evaluó, utilizando las mismas bolsas del experimento semicontrolado, sin embargo, al depositar las larvas de *Galleria mellonella* en las bolsas con suelo, no hubo recuperación de nematodos a los 2, 4 y 6 meses. Puede considerarse que los nematodos una vez que ya no encuentran hospedero, se van a una mayor profundidad del suelo, en donde encuentran una mayor humedad, y pueden sobrevivir en estado de latencia. Por lo tanto, en el caso de las bolsas de plástico, al no poder emigrar hacia una mayor profundidad murieron.

Para comprobar esta hipótesis, en el mes de mayo, antes de que se presentaran las lluvias, se realizó un muestreo en campo en los 27 sitios en donde se obtuvieron muestras positivas de nematodos, a una profundidad de 20 cm, aproximadamente, que fue la profundidad muestreada la primera ocasión. Se le colocaron a las muestras de suelo, larvas de *Galleria mellonella* después de humedecerlas durante 8 días, pero en ninguna muestra hubo presencia de nematodos, lo cual reforzó la idea de que en periodo de secas, los nematodos emigran a una mayor profundidad para poder sobrevivir, es por ello que a la profundidad de 20 cm, no hubo presencia de ellos. La razón de humedecer el suelo antes de colocar las larvas de *G. mellonella*, fue por el hecho de que si los nematodos se encontraban en latencia, darles la oportunidad de que se activaran de nuevo con la humedad y pudieran infectar al hospedero.

8.8 Identificación de los biotipos

Utilizando el procedimiento de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), se identificaron las especies *Heterorhabditis mexicana*, *Steinernema carpocapsae* y *Steinernema feltiae*. Esta es la primera referencia a la presencia de la especie *Heterorhabditis mexicana* en Oaxaca.

Los aislados CH8, LH24, CH5 fueron identificados como *Heterorhabditis mexicana* Nguyen, Shapiro-Ilan, Stuart, McCoy, James & Adams; mientras que el CS2 fue identificado como *Steinernema carpocapsae* Filipjev y el CS1 como *Steinernema feltiae* Filipjev.

8.9 Análisis de correlación y regresiones

Los resultados del análisis de las muestras de suelo, los métodos utilizados y el porcentaje de larvas de *Galleria mellonella* infectadas en cada una de ellas se muestran en el Anexo 6.

A esta información se le realizó un análisis de correlación de Pearson, para determinar hasta que grado y de qué forma (directa o inversamente proporcional) estaban correlacionadas las variables entre sí, los resultados se muestran en el Anexo 6. En el Cuadro 18 se presenta una síntesis del análisis de correlación de Pearson.

Cuadro 18.- Correlación existente entre el porcentaje de mortalidad de larvas de *Galleria mellonella* y los factores pH, materia orgánica, arena arcilla y limo.

	pH	Materia orgánica	Arena	Arcilla	Limo
% de mortalidad	0.78658 0.0070	0.92691 0.0001	-0.91013 0.0003	0.88726 0.0006	0.90297 0.0003

Puede verse en el Cuadro 18 que la correlación existente entre el porcentaje de mortalidad de larvas y los factores edáficos pH, y porcentajes de materia orgánica, arena, arcilla y limo en todos los casos estuvo por arriba de 0.78, lo

cual indicó una alta correlación, considerando que idealmente, el máximo valor que pudiera presentarse es 1. La mayor correlación se presentó con materia orgánica (0.92691) y la menor con pH (0.78658). También se observa en el cuadro 21 que con un $\alpha = 0.05$, en todos los casos se rechazó la hipótesis nula que establece que la correlación entre pares de variables vale cero.

Ante la evidencia de una alta correlación entre el porcentaje de mortalidad de larvas y los factores edáficos pH y porcentajes de materia orgánica, arena, arcilla y limo, se procedió a realizar regresiones entre el porcentaje de mortalidad y cada uno de los factores mencionados para determinar la factibilidad de crear modelos de predicción, los tipos de regresiones que se realizaron en cada caso fueron lineal, exponencial, logarítmica, polinómica y potencial, escogiéndose la que presentara el mayor valor de R^2 . En el eje “y” se consideró el porcentaje de mortalidad de larvas de *P. vetula* y en el eje “x” cada uno de los siguientes conjuntos de variables: pH, porcentajes de materia orgánica, de arena, de arcilla y de limo. Los resultados se describen enseguida.

8.9.1 Mortalidad de *Galleria mellonella* con relación al pH

En el caso de mortalidad de *G. mellonella* con relación al pH, la regresión polinómica fue la que presentó la mayor R^2 (0.685), quedando la ecuación de regresión de la siguiente manera:

$y = 7.242x^2 - 80.80x + 265.1$, Donde y: representa el valor estimado de la mortalidad.

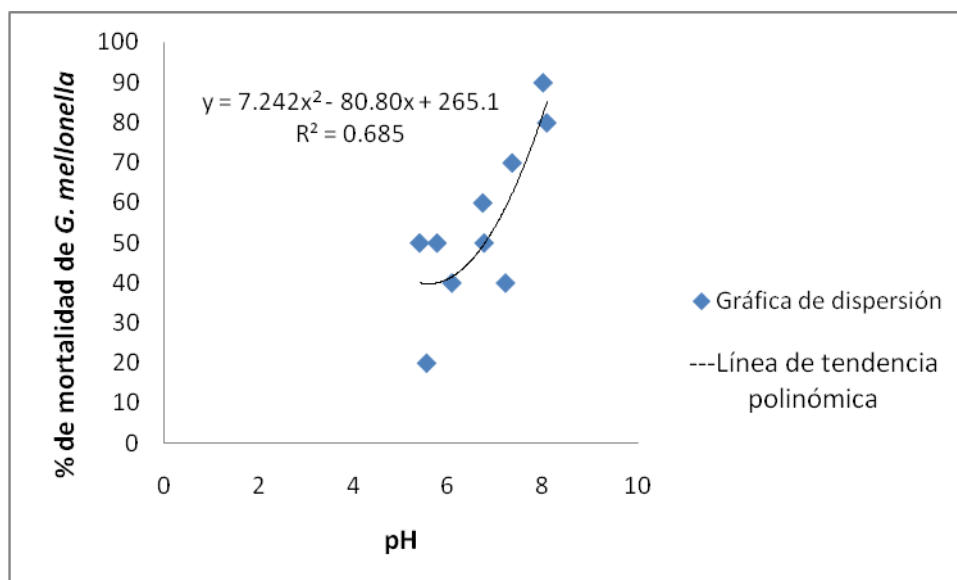
x: el valor observado de pH.

Los demás valores son constantes que estima la regresión.

En la Figura 5 se presenta la gráfica de dispersión, la línea de tendencia polinómica, la ecuación de regresión y la R^2 , para la relación que se da entre las variables porcentaje de mortalidad de *G. mellonella* y pH.

El valor 0.685 de R^2 , significa que el 68.5% de la variabilidad de la variable dependiente (en este caso el porcentaje de mortalidad), fue explicado por la variable independiente pH, lo cual implica que este modelo no sería de utilidad para predecir la mortalidad de *G. mellonella* en los suelos, ya que de manera convencional en la experimentación, y dependiendo claro está de las condiciones particulares de cada caso, un modelo se considera de utilidad para la predicción, cuando su valor de R^2 es por lo menos mayor a 80%.

Figura 5. Gráfica de dispersión, línea de tendencia polinómica, ecuación de regresión y R^2 , para la relación que se da entre las variables porcentaje de mortalidad de *G. mellonella* y pH.



8.9.2 Mortalidad de *Galleria mellonella* con relación a materia orgánica

En el caso de mortalidad de *G. mellonella* con relación al porcentaje de materia orgánica, la regresión potencial fue la que presentó la mayor R^2 (0.929), quedando la ecuación de regresión de la siguiente manera:

$$y = 41.87x^{0.829},$$

Donde y: representa el valor estimado de la mortalidad.

x: el valor observado de porcentaje de materia orgánica.

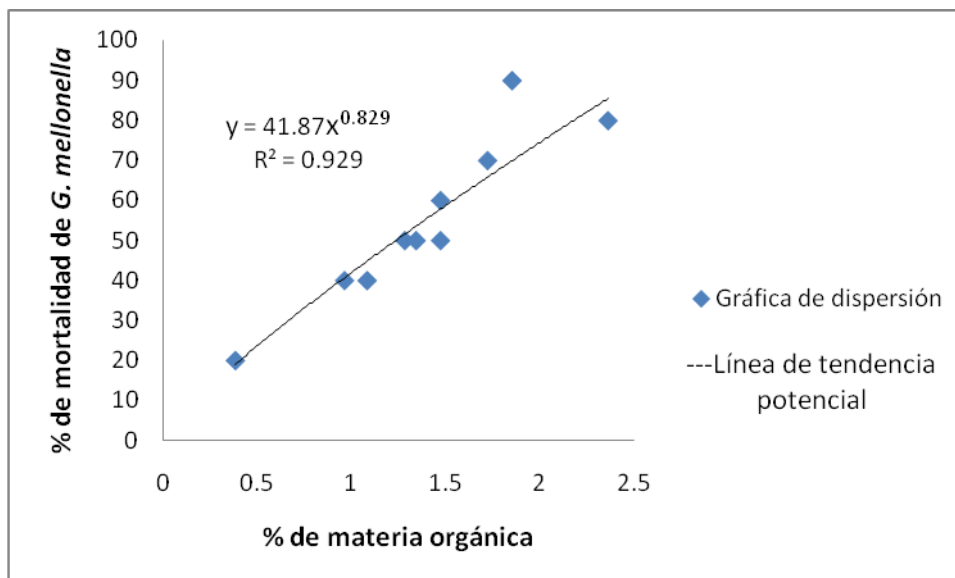
Los demás valores son constantes que estima la regresión.

En la Figura 6 se presenta la gráfica de dispersión, la línea de tendencia potencial, la ecuación de regresión y la R^2 , para la relación que se dió entre las variables porcentaje de mortalidad de *G. mellonella* y porcentaje de materia orgánica.

El valor 0.929 de R^2 , significa que el 92.9% de la variabilidad de la variable dependiente (en este caso el porcentaje de mortalidad), fue explicado por la variable independiente porcentaje de materia orgánica, lo cual implica que este modelo puede ser de utilidad para predecir la mortalidad de *G. mellonella* en los suelos, dado que la R^2 es mayor al 80%, valor convencional que se ha establecido con base en la experiencia en la experimentación como aceptable.

En la Figura 6 puede observarse que a medida que el porcentaje de materia orgánica aumentó, el porcentaje de mortalidad de larvas aumentó también, es decir, estas dos variables presentaron una relación directamente proporcional.

Figura 6. Gráfica de dispersión, línea de tendencia potencial, ecuación de regresión y R^2 , para la relación que se da entre las variables porcentaje de mortalidad de *G. mellonella* y porcentaje de materia orgánica.



8.9.3 Mortalidad de *Galleria mellonella* con relación a arena

Considerando el caso de porcentaje de mortalidad de *G. mellonella* con relación al porcentaje de arena, la regresión polinómica fue la que presentó la mayor R^2 (0.873), quedando la ecuación de regresión de la siguiente manera:

$$y = -0.012x^2 + 0.779x + 69.29,$$

Donde y: representa el valor estimado de la mortalidad.

x: el valor observado de porcentaje de arena.

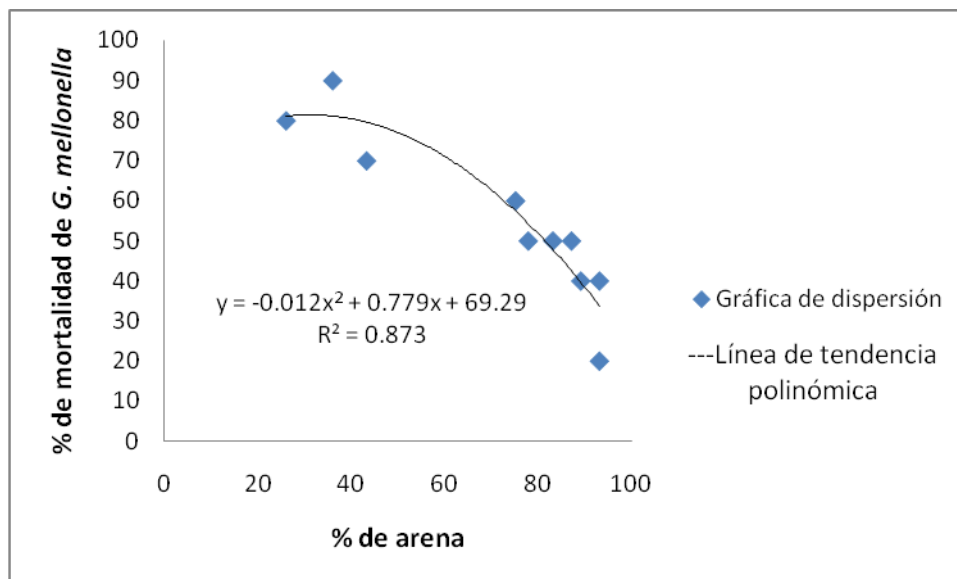
Los demás valores son Constantes que estima la regresión.

En la Figura 7 se presenta la gráfica de dispersión, la línea de tendencia polinómica, la ecuación de regresión y la R^2 , para la relación que se dió entre las variables porcentaje de mortalidad de *G. mellonella* y porcentaje de arena.

El valor 0.873 de R^2 , significa que el 87.3% de la variabilidad de la variable dependiente (en este caso el porcentaje de mortalidad), fue explicado por la variable independiente porcentaje de arena, lo cual implica que este modelo puede ser de utilidad para predecir la mortalidad de *G. mellonella* en los suelos, dado que la R^2 es mayor al 80%, valor convencional que se ha establecido con base en la experiencia en la experimentación como aceptable.

En la Figura 7 puede observarse que a medida que el porcentaje de arena aumentó, el porcentaje de mortalidad de larvas disminuyó; es decir, se tuvo una relación inversamente proporcional entre estas dos variables.

Figura 7. Gráfica de dispersión, línea de tendencia polinómica, ecuación de regresión y R^2 , para la relación que se da entre las variables porcentaje de mortalidad de *G. mellonella* y porcentaje de arena.



8.9.4 Mortalidad de *Galleria mellonella* con relación a arcilla

Analizando la relación entre porcentaje de mortalidad de *G. mellonella* y porcentaje de arena, la regresión logarítmica fue la que presentó la mayor R^2 (0.887), quedando la ecuación de regresión de la siguiente manera:

$$y = 20.31\ln(x) + 6.213,$$

Donde y: representa el valor estimado de la mortalidad.

x: el valor observado de porcentaje de arcilla.

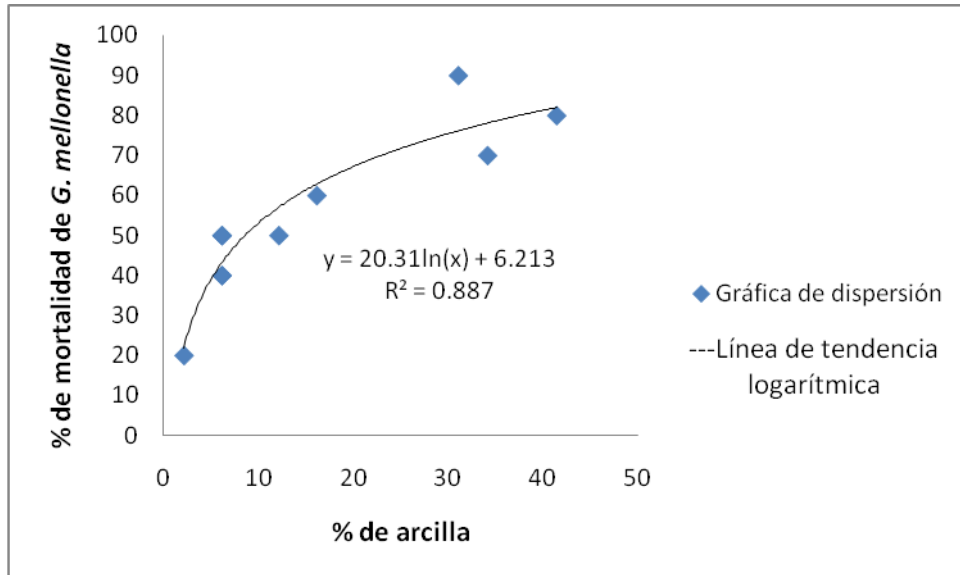
Los demás valores son constantes que estima la regresión.

En la Figura 8 se presenta la gráfica de dispersión, la línea de tendencia logarítmica, la ecuación de regresión y la R^2 , para la relación que se dió entre las variables porcentaje de mortalidad de *G. mellonella* y porcentaje de arcilla.

El valor 0.887 de R^2 , significa que el 88.7% de la variabilidad de la variable dependiente (en este caso el porcentaje de mortalidad), fue explicado por la variable independiente porcentaje de arcilla, lo cual implica que este modelo puede ser de utilidad para predecir la mortalidad de *G. mellonella* en los suelos, dado que la R^2 es mayor al 80%, valor convencional que se ha establecido con base en la experiencia en la experimentación como aceptable.

En la Figura 8 puede observarse que a medida que el porcentaje de arcilla aumentó, el porcentaje de mortalidad de larvas aumentó; es decir, se tiene una relación directamente proporcional entre estas dos variables.

Figura 8. Gráfica de dispersión, línea de tendencia exponencial, ecuación de regresión y R^2 , para la relación que se da entre las variables porcentaje de mortalidad de *G. mellonella* y porcentaje de arcilla.



8.9.5 Mortalidad de *Galleria mellonella* con relación a limo.

Considerando las variables porcentaje de mortalidad de *G. mellonella* y porcentaje de limo, la regresión polinómica fue la que presentó la mayor R^2 (0.817), quedando la ecuación de regresión de la siguiente manera:

$$y = -0.011x^2 + 2.008x + 31.77,$$

Donde y: representa el valor estimado de la mortalidad.

x: el valor observado de porcentaje de limo.

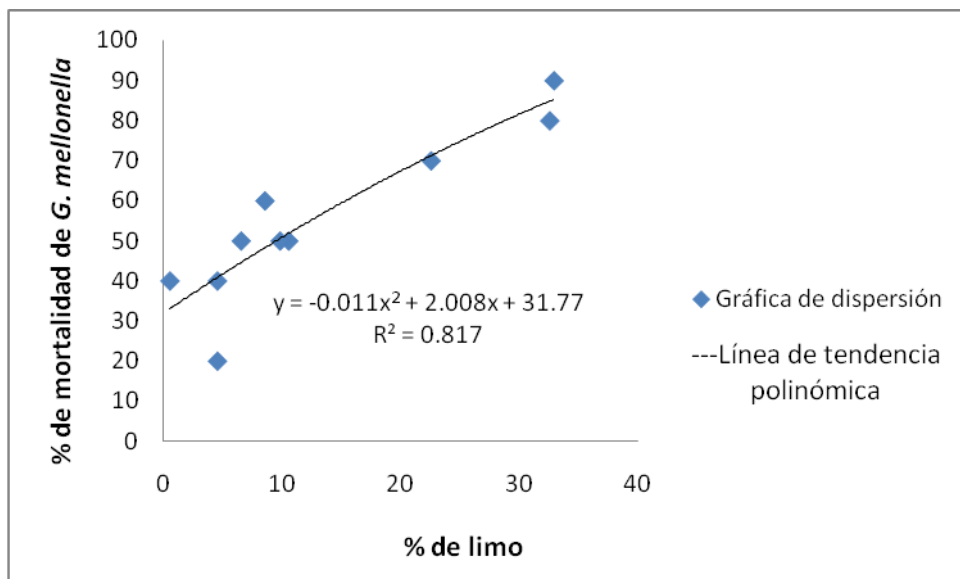
Los demás valores son constantes que estima la regresión.

En la Figura 9 se presenta la gráfica de dispersión, la línea de tendencia polinómica, la ecuación de regresión y la R^2 , para la relación que se dió entre las variables porcentaje de mortalidad de *G. mellonella* y porcentaje de limo.

El valor 0.817 de R^2 , significa que el 81.7% de la variabilidad de la variable dependiente (en este caso el porcentaje de mortalidad), fue explicado por la variable independiente porcentaje de limo, lo cual implica que este modelo puede ser de utilidad para predecir la mortalidad de *G. mellonella* en los suelos, dado que la R^2 es mayor al 80%, valor convencional que se ha establecido con base en la experiencia en la experimentación como aceptable.

En la Figura 9 puede observarse que a medida que el porcentaje de limo aumentó, el porcentaje de mortalidad de larvas aumentó; es decir, se tiene una relación directamente proporcional entre estas dos variables.

Figura 9. Gráfica de dispersión, línea de tendencia polinómica, ecuación de regresión y R^2 , para la relación que se da entre las variables porcentaje de mortalidad de *G. mellonella* y porcentaje de limo



9. DISCUSIÓN

Muestreo de suelos

El porcentaje de muestras positivas (con presencia de nematodos) obtenido de la colecta de muestras de suelo en este estudio fue de 29%; Stock, *et al.* (1999), mencionan que en un muestreo realizado en diferentes hábitats en el estado de California USA, encontraron 26.3% de muestras positivas; Stock y Gress, (2006) realizaron un muestreo en cuatro montañas del sureste de Arizona USA, reportando de un total de 120 muestras el 23.3% positivas; Khatri-Chhetri, *et al.*, (2007) encontraron en Nepal el 10.50% de muestras positivas de un total de 276; Ruiz-Vega, *et al.*, (2003), reportaron un 8.9% como el máximo porcentaje encontrado en territorio oaxaqueño; Argotti *et al.*, (2011) encontraron en Ecuador 7.8% de muestras positivas. Comparando los resultados de este estudio con los otros trabajos mencionados el porcentaje reportado en éste es más alto en todos los casos y difiere en aproximadamente 20 puntos porcentuales de los dos últimos; sin embargo, en los otros estudios, el muestreo fue al azar, considerando diferentes hábitats, mientras que en el estudio actual, el muestreo no fue al azar, sino que fue dirigido a terrenos agrícolas con cultivo de maíz y a zonas específicas dentro de éste, en donde ya se sabía de la presencia de la plaga de gallina ciega; normalmente donde se encuentra la plaga se encuentran sus enemigos naturales. Esta idea se refuerza por lo mencionado por Ruiz-Vega, *et al.*, 2003, quienes encontraron que los mayores porcentajes de muestras de suelo con nematodos se encontraron en donde había presencia de gallina ciega.

En cuanto a porcentaje por género, el presente estudio reportó 69% para el género *Steinernema* y 31% para *Heterorhabditis*, esto coincide con los resultados de otros investigadores que también reportan haber encontrado en muestreos realizados, una mayor proporción para el género *Steinernema* comparado con *Heterorhabditis*. Stock, *et al.*, (1999), encontraron 80% para *Steinernema* y 20% para *Heterorhabditis*; Stock y Gress, (2006) reportaron 78.5% para *Steinernema* y 21.5% para *Heterorhabditis*; Khatri-Chhetri, *et al.*,

(2007) en su estudio mencionan 75.86% para *Steinernema* y 24.14% para *Heterorhabditis*; Ruiz-Vega, et al., (2003), encontraron 67% para *Steinernema* y 33% para *Heterorhabditis* y Argotti, et al., (2011) reportaron 54% para *Steinernema* y 46% para *Heterorhabditis*. En todos los casos mencionados, se encontró una mayor proporción del género *Steinernema*, comparado con *Heterorhabditis*; esto está relacionado con el hecho de que los hospederos de los nematodos entomopatógenos tales como *Phyllophaga* spp. se encuentran por lo general en suelos con alto contenido de materia orgánica y pH ácido (Jackson, 2003) y ahí se encuentran también generalmente sus enemigos naturales como es el caso de los nematodos entomopatógenos (Ruiz-Vega, et al., 2003); sin embargo, los nematodos entomopatógenos del género *Steinernema* han generado una mayor tolerancia a la acidez (Argotti, et al., 2011), lo que les ha permitido encontrarse en una mayor proporción en los suelos con las características antes descritas. En el presente estudio, el 60% de las muestras presentaron pH ácido, lo cual seguramente está relacionado con haber encontrado una mayor proporción del género *Steinernema* (69% de las muestras positivas).

Las especies identificadas fueron *Heterorhabditis mexicana*, *Steinernema feltiae* y *Steinernema carpocapsae*. Este es el primer reporte que se tiene para *H. mexicana* en el estado de Oaxaca, mientras que *Steinernema feltiae* y *Steinernema carpocapsae* ya habían sido reportados (Ruiz-Vega et al., 2003; Aquino et al., 2006). *S. feltiae* fue localizado en una zona de *Quercus* spp mientras que *S. carpocapsae* fue encontrado en una plantación de *Agave angustifolia* Haw.

Evaluación en laboratorio

De acuerdo con el modelo estadístico general el factor de mayor peso para generar significancia fue la dosis de nematodos aplicada, seguido por el biotipo; esto coincide con Rodríguez, et al., (2009), quienes reportan en un experimento donde aplicaron *Heterorhabditis* sp. Para el control de *Phyllophaga eleanans*, que la dosis fue el factor más importante, notándose claramente que a

medida que la dosis se incrementó el tiempo letal medio para matar el 50% de larvas disminuyó, pasando de 17.5 días para una dosis de 225 nematodos por larva a 7.5 días para una dosis de 625 nematodos por larva, al final recomienda que habrá que probar con dosis mayores, en este estudio se requirió una dosis de 326 a 348 nematodos por larva del género *Heterorhabditis* para lograr una mortalidad de 50% de larvas de *Phyllophaga vetula* a los diez días y de 382 a 405 en el caso del género *Steinernema*.

La mejor dosis de aplicación de nematodos tanto para steinernemátidos como para heterorhabdítidos fue de 1000 nematodos por larva, este dato coincide con lo encontrado por Athanassiou, *et al.*, (2010), quienes reportaron que al realizar bioensayos en laboratorio, para el control de larvas de *Tribolium confusum* Jacquelin du Val (Coleoptera: Tenebrionidae), aplicando *Steinernema feltiae*, la dosis que causó la mayor mortalidad (arriba de 56%) fue de 1000 nematodos por larva, dosis menores causaron mortalidades menores de 56%. Trdan, *et al.*, (2009), mencionaron que para el control de larvas del escarabajo de la papa (*Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera, Chrysomelidae) las mejores dosis fueron de 1000 y 2000 nematodos por larva.

En este estudio así como en los que se citan, las mayores dosis (1000 nematodos por larva) presentaron el mayor control del organismo blanco; esto se debe a que entre mayor sea la densidad de nematodos entomopatógenos, hay una mayor posibilidad de que el nematodo entre en contacto con la larva o sobrepase los mecanismos de defensa de ésta (Rodríguez, *et al.*, 2009).

Los heterorhabdítidos se agruparon en un grupo estadístico diferente al de los steinernemátidos, siendo los primeros más efectivos para el control de *Phyllophaga vetula*.

Los heterorhabdítidos presentaron las menores dosis letales tanto en 50 como en 95, en el caso de dosis 50, variaron de 326 a 348 y en dosis 95 de 602 a 726; mientras que los steinernemátidos variaron en dosis 50 de 382 a 405 y en dosis 95 de 920 a 998; Rodríguez, *et al.*, (2009) reportaron en el control de *Phyllophaga eleanans* aplicando *Heterorhabditis* sp, una dosis 50 de 475

nematodos por larva. Medeiros *et al.* (2000) encontraron una dosis 50 de 321 nematodos por larva al aplicar *Steinernema carpocapsae* a larvas de sexto estadio de *Pseudloetia unipunctata* (Lepidoptera: Noctuidae).

También en el caso de tiempos letales para el control de *Phyllophaga vetula* los heterorhabdítidos presentaron los menores valores, variando en tiempo letal 50 de 2.7 a 3.1 y en tiempo letal 95 de 6.2 a 7.1; mientras que los steinernemátidos variaron de 4.0 a 4.1 y de 9.8 a 10.3 en tiempos letales de 50 y 95 respectivamente. Koehler, *et al.*, (1992) reportaron en cuatro tipos de cucarachas (Dictyoptera: Blattellidae, Blattidae) tiempos letales para alcanzar un 50% de mortalidad de 3.25, 4.13, 9.86, y 11.38. Ruiz-Vega *et al.*, 2003, mencionaron tiempos letales 50 de 3 a 7 días para el caso de *Steinernema carpocapsae* y *Steinernema feltiae* aplicados a larvas de *Phyllophaga vetula*.

Los nematodos entomopatógenos poseen diferentes estrategias para encontrar y parasitar a su hospedero, existen los que son cazadores buscadores, los cuáles son altamente móviles y buscan activamente a su presa, y los cazadores emboscadores que acechan a su presa y la esperan por donde va a pasar, éstos tienen poca movilidad (Kaya y Gaugler, 1993); en este estudio, fueron los nematodos heterorhabdítidos los que presentaron mayor eficacia para controlar la plaga de *P. vetula*; según Cui *et al.*, (1993) los nematodos del género *Heterorhabditis* son cazadores buscadores y tienen una alta movilidad, por su parte, *S. carpocapsae* posee una estrategia emboscadora que consiste en posarse y esperar al hospedero, y *S. feltiae* posee características intermedias entre buscador y emboscador, Kaya y Gaugler, (1993); esto influyó seguramente para que los heterorhabdítidos tuvieran mayor eficacia en el control de *P. vetula*, plaga que según Lewis *et al.*, (1992), tiene poca movilidad en el suelo dificultando el ser encontrada por los nematodos emboscadores.

Correlación entre la presencia de nematodos en el suelo y los factores pH y porcentajes de materia orgánica, arena, arcilla y limo

Los resultados de este estudio, mostraron que hay una alta correlación entre la presencia de nematodos entomopatógenos en el suelo y los factores pH y porcentajes de materia orgánica, arena, arcilla y limo; Kaya y Gaugler, (2003), mencionan que varios factores edáficos tales como textura, humedad y pH, influyen en la presencia de nematodos entomopatógenos en el suelo. Según Jackson (2003), los parámetros tales como pH, estructura y fertilidad pueden ayudar a predecir la existencia de nematodos en determinados suelos. Es muy probable encontrar estos organismos en suelos francos, bajo pH y relativamente alta fertilidad en términos de nutrientes disponibles.

De acuerdo con los resultados de este estudio, no se encontró una dependencia clara entre la presencia de nematodos entomopatógenos en el suelo y los valores de pH, presentando el modelo de regresión polinómica una R^2 de 0.685; sin embargo, el promedio de pH encontrado en los suelos fue de 6.7 lo cual coincide con Aguirre y Salazar, (1999) quienes mencionan que la mayor efectividad de los nematodos se presenta en suelos con pH ligeramente ácido. Se presentó una relación directamente proporcional entre el porcentaje de materia orgánica y el porcentaje de mortalidad de larvas (con una R^2 de 0.929, en la regresión potencial) esto coincide con Jackson, (2003), que establece que a mayor fertilidad de los suelos, mayor probabilidad de presencia de nematodos, debido a una mayor aireación y porosidad, condición indispensable; así como la presencia de humedad, para la sobrevivencia de los nematodos). Los suelos con alto contenido de arena, retienen poca humedad y por lo tanto, presentan condiciones adversas para la sobrevivencia de los nematodos entomopatógenos (Gaugler, 1999), en este trabajo, las menores mortalidades de larvas se presentaron en suelos con alto contenido de arena, lo cual fue indicativo de poca presencia de nematodos; la regresión polinómica fue la que presentó la mayor R^2 (0.873). Una de las condiciones para la sobrevivencia de los nematodos es la presencia de humedad (Gaugler, 1999). La arcilla se caracteriza por alta retención de humedad, pero también por

presentar poca aireación en sus suelos debido a su escasa porosidad. En estos resultados se reporta que a medida que el contenido de arcilla aumentó, la mortalidad de larvas aumentó, pero sólo hasta cierto punto, puesto que la máxima mortalidad no se da en el máximo valor de arcilla, esto puede deberse a que a altos contenidos de arcilla, la aireación es menor y puede afectar de manera negativa la sobrevivencia de los nematodos; la regresión logarítmica fue la que presentó la mayor R^2 (0.887). El limo favorece la retención de agua y por lo tanto, la presencia de nematodos; en este estudio a medida que el porcentaje de limo aumentó, la mortalidad de larvas aumentó; la regresión polinómica presentó la mayor R^2 (0.817). Es fundamental entender de que manera afectan los factores edáficos la densidad de nematodos entomopatógenos en el suelo, para poder utilizarlos con éxito como medio de control biológico (Smart and Nguyen, 1994).

10. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

Se aislaron e identificaron tres géneros de nematodos entomopatógenos en los Valles Centrales de Oaxaca; *Steinernema feltiae*, *Steinernema carpocapsae* y *Heterorhabditis mexicana*.

Heterorhabditis mexicana, presentó mayor eficacia para el control de *Phyllophaga vetula*; sin embargo, las especies *Steinernema feltiae* y *Steinernema carpocapsae* también presentaron potencial para el control de dicha plaga, provocando más del 90% de mortalidad en laboratorio y más del 80% en experimento de campo semicontrolado.

El hecho de cribar los biotipos por su capacidad para parasitar a *Galleria mellonella* y *Tenebrio molitor*, resultó un buen método para determinar los biotipos más virulentos.

La dosis de aplicación de nematodos más efectiva para el control de *Phyllophaga vetula* fue de 1000 nematodos por larva, en las tres especies identificadas.

Las formas de aplicación de los nematodos, más eficaces para el control de *Phyllophaga vetula* fueron medio acuoso y cadáver de *Galleria mellonella*.

El contenido de humedad en el que se presentó un mayor control de *Phyllophaga vetula* fue humedad baja (-0.6 MPa).

Sólo la presentación en medio acuoso de los nematodos, permitió su sobrevivencia hasta los tres meses de almacenados a temperatura ambiente.

No hubo persistencia de los nematodos en el suelo en el experimento de campo semicontrolado, cuando se intentó recuperarlos a los dos, cuatro y seis meses el resultado fue negativo.

Fue posible bajo las condiciones particulares de este estudio generar modelos de predicción de la presencia de nematodos en el suelo para el caso de las variables materia orgánica, arena, arcilla y limo.

Recomendaciones

Se deben seguir realizando muestreos de suelo en otras regiones para poder establecer un mapa de la distribución geográfica de los nematodos en el estado de Oaxaca, para posteriormente evaluarlos en laboratorio y en campo en diferentes cultivos y plagas y poder así determinar su potencial como agentes de biocontrol como una alternativa al uso de insecticidas químicos.

11. LITERATURA CITADA

Aguirre-Urbe L. A. y Salazar-Silva C. 1999. Prólogo. *In: Potencial de Nematodos Entomopatógenos en el Control de plagas*. H. C. Arredondo; J. Molina y V. M. Hernández (Eds.). Universidad de Colima. Colima, Col., México. Pp. 9-10.

Akhurst R. J. 1980. Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically-associated with insect pathogenic nematodes *Neoplectana* and *Heterorhabditis*. *J. Gen. Microbiol.*, 121: 303-309.

Alumai A., Grewal P. S., Casey W. H. and Willoughby D. A. 2005. Factors affecting the natural occurrence of entomopathogenic nematodes in turfgrass. *J Biological Control*, March (36): 368-374.

Aquino B. T., Ruiz V. J. e Iparraguirre C. M. 2006. Control biológico del picudo negro (*Scyphophorus interstitialis* Gyllenhal) con nemátodos y hongos entomopatógenos en agave en Oaxaca, México. *Revista UDO Agrícola* 6(1): 92-101.

Argotti E., Hernández C., Cazar M., Gallegos P., Alcázar J. y Kaya H. 2011. Aislamiento de nemátodos entomopatógenos del género *Steinernema* y *Heterorhabditis* en sistemas de producción asociados a cultivos de *Solanum tuberosum*. *ESPE Ciencia y Tecnología*, Vol. 3 (1): 1-11.

Athanassiou C. G., Kavallieratos N. G., Menti H., and Karanastasi E. 2010. Mortality of Four Stored Product Pests in Stored Wheat When Exposed to Doses of Three Entomopathogenic Nematodes. *Journal of Economic Entomology* 103(3):977-984.

Azorín P. F. 1972. *Curso de Muestreo y Aplicaciones*. Ed. Aguilar. Madrid, España.

Cui L., Gaugler R. and Wang Y. 1993. Penetration of steinernematid nematodes (Nematoda: Steinernematidae) into Japanese beetle larvae, *Popilia japonica* (Coleoptera: Scarabeidae). *J. Invertebr. Pathol*, 62: 73-78.

Dirt Works. 2001. Available in:
<http://www.dirtworks.net/Images/NCO/nematode/Nematodecycle.jpg>.
Accessed: February 2007.

Dout, R. L. 1982. El desarrollo histórico del control biológico. *In: Control biológico de las plagas de insectos y malas hierbas*. De Bach, P. (Editor). Pp.49-71.

Ellis R. E., Sulston J. E. and Coulson A. R. 1986. The rDNA of *C. elegans*: Sequence and structure. *Nucleic Acids Research* 14: 2345–2364.

García R., Caltagirone L. E. and Gutierrez A. P. 1988. Comments on a redefinition of biological control. *Bio Science* 38: 692-694.

Gaugler R. 1999. Ecological Considerations in the biological control of soil inhabiting insects with entomopathogenic nematodes. *Agriculture Ecosystems and Environment*, 24: 351-360.

Gaugler R., McGuire T. and Campbell J. 1989. Genetic variability among strains of the entomopathogenic nematodes. *Oecology*, 109: 483-489.

Georgis R. 1991. Present and future prospect for entomopathogenic nematode products. *Biocontr. Sci. Technol.*, 2: 83-99.

González M. A. 1989. Investigaciones realizadas sobre *Phyllophaga* spp. atacando cafeto en El Salvador, p. 20. *In: Taller Regional Integrado de Plagas*.

Grewal P. and Georgis R. 1998. Entomopathogenic nematodes. *In: "Methods in Biotechnology" Vol. 5, "Biopesticides: Use and Delivery"*. F. R. Hall and J. J. Menn (Eds.). Humana Press, Totowa, New Jersey, U. S. A. Pp. 271-299.

Grewal P. S., Ehlers R-U, and Shapiro-Ilan D. I. 2005. Nematodes as Biocontrol Agents. CABI, New York, NY.

Grewal P. S., Gaugler R. and Campbell J. F. 1994. Host finding behaviour as a predictor of foraging strategy in entomopathogenic nematodes. *Parasitology*, 108: 207-215.

Hamblin A. P. 1981. Filter- paper method for routine measurement of field water potential. *J. Hydrol.*, 53: 355 – 360.

Hominick W. M. Biogeography. 2002. In: Gaugler R. (Ed.). Entomopathogenic entomology. Wallingford, UK: CAB International, pp. 115-143.

Hominick W. M., Briscoe B. R., Del Pino F. G., Heng J., Hunt D. J., Kozodoy E., Mracek Z., Nguyen K. B., Reid A. P., Spirinodov S., Stock P., Sturhay D., Waturu C. and Yoshida M. 1997. Biosystematics of entomopathogenic nematodes: current status, protocols and definitions. *J. Helminthol.*, 71: 271-298.

Jackson T. A. 2003. Using entomopathogens in scarab pest management, pp. 333-334. *In: Estudios Sobre Coleópteros del suelo en América*. Aragón, G. A., M. A. Morón y A. Marín J. (Eds.). Publicación especial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, Pue., México.

Kaya H. K. and Gaugler R. 1993. Entomopathogenic nematodes. *Annu. Rev. Entomol.*, 38: 181-206.

Kaya H. K. and Koppenhofer A. M. 1996. Effects of microbial and other antagonistic organism and competition on entomopathogenic nematodes. *Biocontrol Sci. and Technol.* 6: 357-371.

Khatri-Chhetri H. B., Waeyenberge L., Manandhar H. K. and Moens M. 2010. Natural occurrence and distribution of entomopathogenic nematodes

(Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Nepal. J Invertebr Pathol Jan; 103(1):74-8.

Koehler P. G., Patterson R. S. and Martin W. R. 1992. Susceptibility of cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae, Blattidae) to infection by *Steinernema carpocapsae*. J Econ Entomol 85 (4): 1184

Koppenhofer A. M. 2007. Nematodes. In: L. A. Lacey and H. K. Kaya, eds. Field manual of techniques in invertebrate pathology Application and evaluation of pathogens for control of insects and other invertebrate pests, second ed. Dordrecht: Springer. Pp. 249-264.

Koppenhofer A. M. and Fuzy E. M. 2006. Effect of soil type on infectivity and persistence of the entomopathogenic nematodes *Steinernema scarabaei*, *Steinernema glaseri*, *Heterorhabditis zealandica*, and *Heterorhabditis bacteriophora*. Journal of Invertebrate Pathology 92:11–22.

Koppenhofer A. M., Polavarapu S., Fuzy E. M., Zhang A., Ketner K. and Larsen T. 2005. Mating disruption of oriental beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) in turfgrass using microencapsulated formulations of sex pheromone components. Environmental Entomology 34:1408-1417.

Lacey L. A. and Kaya H. K. 2000. Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology. J. of Invertebr. Pathol. 84:15-23.

Lewis E. E., Gaugler R. and Harrison R. 1992. Entomopathogenic nematode host finding: response to host contact cues by cruise and ambush foragers. Parasitology, 105: 103-107.

Marh S. 2001. The nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. University of Wisconsin, Madison, U. S. A.

Medeiros J., Rosa J. S., Tavares J. and Simoes N. 2000. Susceptibility of *Pseudaletia unipunctata* to entomopathogenic nematodes isolated in the Azores. Effect of nematode strain and host age. *Journal of Economic Entomology*, 93 (5): 1403-1408.

Metcalf C. L. y Flint W. P. 1982. Insectos destructivos e insectos útiles, sus costumbres y su control. Ed. CECOSA. México, D. F., pp. 92-98.

Morón M. A. 1983. Introducción a la biosistemática y ecología de los Melolonthidae edafícola de México. II Mesa redonda sobre plagas del suelo, Chapingo, Méx.

Morón M. A. 1986. Revisión del género *Phyllophaga* Harris en México. (Insecta Coleóptera Melolonthidae). *Instituto de Ecología, Jalapa, Ver.* 20: 1-375.

Poinar G. Jr. 1990. Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. *In: Entomopathogenic nematodes in biological control.* R. Gaugler and H. Kaya (Eds.). CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, U. S. A. Pp. 33-61.

Poinar G. O. Jr. 1975. Description and biology of a new insect parasitic rhabditoid *Heterorhabditis bacteriophora* n. gen. n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae n. fam.). *Nematologica*, 21: 463-470.

Rodríguez D., Torres M., Uribe L., y Flores L. 2009. Susceptibilidad de los estadios L2 y L3 de *Phyllophaga elenans* a una cepa nativa de *Heterorhabditis* sp. en condiciones de invernadero. *Agronomía Costarricense* 33(2): 171-182.

Romero P. S. 1980. Plagas del maíz en México. Memoria VIII Simposio Nacional de Parasitología Agrícola, México, D. F. Pp. 21-28

Roush T. R. 1990. Genetic variation in natural enemies: critical issues for colonization in biological control. *In: Critical Issues in Biological control.* Eds. M. Mackauer, L. E. Ehler, and J. Roland. Pp. 263-288.

Ruiz –Vega J., Aquino-Bolaños T., Kaya H. K. y Stock P. 2003. Colecta y evaluación de nematodos entomopatógenos para el control de gallinas ciegas *Phyllophaga vetula* (Horn) en Oaxaca, México. *Folia Entomol. Mex.*, 42 (2): 169-175.

Ruiz V. J., Aquino T. and Kaya H. K. 2000. Controlling white grubs (*Phyllophaga* spp.) with entomopathogenic nematodes and fungi in Oaxaca, México. Abstracts del XXXIII Congreso de la Society for Invertebrate Pathology, agosto 13-18 del 2000. Guanajuato, Gto., México. P. 84.

Ruiz V. J., Arce F., García J. y Kaya H. K. 1998. Colecta de nematodos entomopatógenos para el control de larvas de escarabeidos en Oaxaca, Memorias del XXIII Congreso Nacional de Entomología, Acapulco, México. Pp. 254-256.

SARH, 1988. Principales plagas del maíz. Dirección General de Sanidad. Talleres Gráficos de la Nación. México, D. F., pp. 29-32.

SAS Institute Inc., SAS/STAT . 1988. Guide for Personal Computers, U. S. A.

Saunders J. L. 1998. Las plagas invertebradas de cultivos alimenticios anuales en América Central. CETIE. Turrialba, p. 306.

Shapiro-Ilan D. I., Lewis E. E., Behle R. W., and McGuire M. R. 2001. Formulation of entomopathogenic nematode-infected cadavers *Journal of Invertebrate Pathology* 78 (1), 17-23.

Smart G. C. Jr. and Nguyen K. B. 1994. Role of entomopathogenic nematodes in biological control. *In: Pest management in the subtropics: Biological control a Florida perspectiva.* D. Rosen, F. D. Bennett y J. L. Capinera (Eds). UK, Andover Intercept. Pp. 231-252.

Stock S. P. and Gress J. C. 2006. Diversity and phylogenetic relationships of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) from the Sky Islands of Southern Arizona. *J Invertebr Pathol* Jun; 92(2):66-72.

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

Stock S. P., Pryor B. M. and Kaya H. K. 1999. Distribution of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) in natural habitats in California, USA. *Biodiversity and Conservation* 8: 535-549.

Tanada Y. and Kaya H. K. 1993. *Insect pathology*. Academic Press Inc. San Diego, Ca., USA. P. 666.

Trdan S., Vidrih M., Andjus L. and Laznik Z. 2009. Activity of four entomopathogenic nematode species against different developmental stages of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera, Chrysomelidae). *Helminthología*, 46, (1): 14-20.

Van D.R.G. and Bellows T. S. Jr. 1996. Biology and Dynamics of Pathogens. *In* *Biological Control*. Ed. Chapman & Hall. Nueva York, U. S. A. Pp. 337-353.

Villalobos J. F. 1992. The potential of entomopathogens for the control of white grub pests of corn in Mexico. *In*: *Use of pathogens in scarab pest management*. T. A. Jackson y T. R. Glare (Eds.). Intercept Ltd., Andover, Hampshire. Pp. 253-260.

Wang X. and Grewal P.S. 2002. Rapid genetic deterioration of environmental tolerance and reproductive potential of an entomopathogenic nematode during laboratory maintenance. *Biological Control* 23: 71-78.

Wilson G. 1969. White grubs as pest of sugar cane. Elsevier, 31: 237-258.

Woodring J. L. and Kaya H. K. 1998. *Steinernematid* and *Heterorhabditid* nematodes: hand book of biology and techniques. South cooperative Ser. Bulletin Arkans.Agricultural Exp. Stn., Fayetteville., 331: 1-30.

Zhou W., Rousset F. and O'Neil S. 1998. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. Proc Biol Sci 265: 509-515.

12. ANEXOS

Anexo 1.-Resultados del muestreo de suelos para aislar nematodos entomopatógenos (NE) en los Valles Centrales de Oaxaca en el periodo de agosto a octubre de 2008.

No. de muestra	Lugar	Paraje	Cultivo	Género probable	Presencia de NE
1	Cuilapam	Huamucho I	M-C	<i>Steinernema</i>	Si
2	Cuilapam	Llano I	M	<i>Steinernema</i>	Si
3	Cuilapam	Huamucho II	M	-----	No
4	Cuilapam	Llano II	M	<i>Steinernema</i>	Si
5	Cuilapam	Llano III	M-C	<i>Heterorhabditis</i>	Si
6	Cuilapam	Llano IV	M	-----	No
7	Cuilapam	Llano V	M-F-C	-----	No
8	Cuilapam	Bajo el Huamucho	M	<i>Heterorhabditis</i>	Si
9	Santiaguillo, Etlá	Junto a la carretera	M-F-C	-----	No
10	Santiaguillo, Etlá	Junto al puente	M	-----	No
11	Guadalupe, Etlá	El Río I	M	-----	No
12	Cuilapam	Llano VI	M	-----	No
13	Zaachila	CBTA I	M	-----	No
14	Zaachila	CBTA II	M-C	-----	No
15	Zaachila	El Centro	M-C	<i>Steinernema</i>	Si
16	Zaachila	CBTA III	M-C	-----	No
17	Guadalupe, Etlá	Invernadero	M-F	<i>Steinernema</i>	Si
18	Guadalupe, Etlá	La Barranca	M	<i>Steinernema</i>	Si
19	Guadalupe, Etlá	El Río II	M	-----	No
20	CIIDIR	Frente al jardín botánico	M-F	<i>Steinernema</i>	Si
21	CIIDIR	Junto al campo de fútbol	M	<i>Steinernema</i>	Si
22	CIIDIR	Frente al aula magna	M	-----	No
23	San Dionisio, Ocotlán	Vivero I	M-F-M	-----	No
24	Lachigolo, Tlacolula	El Arroyito	M	<i>Heterorhabditis</i>	Si

25	San Dionisio, Ocotlán	Vivero II	M	<i>Steinernema</i>	Si
26	San Dionisio, Ocotlán	El Pueblo	M	-----	No
27	San Dionisio, Ocotlán	Vivero III	M	-----	No
28	Guadalupe, Etlá	El Río III	M	-----	No
29	Guadalupe, Etlá	El Río IV	M	-----	No
30	Reyes Mantecón, San Bartolo Coyotepec	El Chamizo	M-C	-----	No
31	Reyes Mantecón, San Bartolo Coyotepec	Chalio	M-C	-----	No
32	Reyes Mantecón, San Bartolo Coyotepec	San Antonio	M-C	-----	No
33	Reyes Mantecón, San Bartolo Coyotepec	El Guapo (bajo el huamuche)	M-C	-----	No
34	Reyes Mantecón, San Bartolo Coyotepec	San Francisco	M-H	-----	No
35	Reyes Mantecón, San Bartolo Coyotepec	Los Cerritos	M-F	-----	No
36	Reyes Mantecón, San Bartolo Coyotepec	Panteón	M	-----	No
37	Reyes Mantecón, San Bartolo Coyotepec	El Maguey	M	-----	No
38	Santa Cruz Mixtepec	La Arena I	M-C	<i>Steinernema</i>	Si
39	Santa Cruz Mixtepec	La Arena II	M	<i>Steinernema</i>	Si
40	Sta. Inés,	La Colonia I	M	-----	No

	Ayoquezco				
41	Sta. Inés, Ayoquezco	La Colonia II	M-C	<i>Steinernema</i>	Si
42	Sta. Inés, Ayoquezco	La Colonia III	M-C	<i>Steinernema</i>	Si
43	San Pedro Mártir, Ocotlán	La Parada I	M	<i>Steinernema</i>	Si
44	San Pedro Mártir Ocotlán	La Parada II	M-F	<i>Heterorhabditis</i>	Si
45	San Pedro Mártir, Ocotlán	La Parada III	M	<i>Steinernema</i>	Si
46	San Pedro Mártir, Ocotlán	La Parada IV	M-C	<i>Steinernema</i>	Si
47	Los Ocotes, Ejutla	El Llano I	M-C	<i>Steinernema</i>	Si
48	Los Ocotes, Ejutla	El Llano II	M-C	<i>Heterorhabditis</i>	Si
49	Los Ocotes, Ejutla	El Llano III	M-C	<i>Steinernema</i>	Si
50	Los Ocotes Ejutla	El Llano IV	M-C	<i>Steinernema</i>	Si
51	Sta. Cruz San Pablo, Etlá	El Mameyal I	M-F	<i>Steinernema</i>	Si
52	Sta. Cruz San Pablo, Etlá	El Mameyal II	M-F	<i>Steinernema</i>	Si
53	Sta. Cruz San Pablo, Etlá	El Mameyal III	M-F	-----	No
54	Sta. Cruz San Pablo, Etlá	La Loma I	M-F	<i>Steinernema</i>	Si
55	Sta. Cruz San Pablo, Etlá	La Loma II	M-F	-----	No

M:Maíz, M-F:Maíz-Frijol, M-C:Maíz-Calabaza, M-CC:Maíz-Cacahuete, M-H:Maíz Higuierilla, M-F-C:Maíz-Frijol-Calabaza, M-F-M:Maíz-Frijol-Maguey.

Anexo 2.- Análisis de varianza general y por factores del porcentaje de mortalidad de *Tenebrio molitor* debido a la aplicación de los diferentes tratamientos resultantes de la combinación de cinco biotipos de nematodos por cinco dosis de aplicación.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Prob > F
Modelo	24	90.96	< 0.0001
Error	75		
Total	99		

R² =0.96 Coeficiente de variación = 13.55%

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Prob > F
Tratamiento	24	90.96	< 0.0001
Nematodo	4	2.55	0.0562
Dosis	4	536.76	< 0.0001

Anexo 3.- Análisis de varianza general y por factores del porcentaje de mortalidad de *Phyllophaga vetula* debido a la aplicación de los diferentes tratamientos resultantes de la combinación de cinco biotipos de nematodos por cinco dosis de aplicación.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Prob > F
Modelo	24	43.11	< 0.0001
Error	75		
Total	99		
R ² =0.91		Coeficiente de variación = 14.02%	

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Prob > F
Tratamiento	24	43.11	< 0.0001
Nematodo	4	14.35	0.0258
Dosis	4	485.12	< 0.0001

Anexo 4.- Análisis de varianza general y por factores del porcentaje de mortalidad de *Phyllophaga vetula* debido a la aplicación de los diferentes tratamientos resultantes de la combinación de cinco biotipos de nematodos por tres formulaciones por dos contenidos de humedad.

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Prob > F
Modelo	29	19.28	< 0.0001
Error	90		
Total	119		
$r^2 = 0.86$		Coeficiente de variación = 14.34%	

Fuente de variación	Grados de libertad	F	Prob > F
Nematodo	4	26.69	< 0.0001
Formulación	2	93.79	< 0.0001
Humedad	1	110.69	< 0.0001

Anexo 5.- Resultados del análisis de muestras de suelo de 10 sitios de comunidades de Valles Centrales de Oaxaca, métodos de análisis utilizados y porcentaje de larvas de *Galleria mellonella* infectadas por nematodos.

No.de muestra Y comunidad	pH	% materia orgánica	% de arena	% de arcilla	% de limo	Textura	% de larvas infectadas	
1 Cuilapam	5.77	1.466	83.28	6.16	10.56	Arenoso franco	50	
2 Cuilapam	5.55	0.382	93.28	2.16	4.56	Arena	20	
5 Cuilapam	7.21	0.956	93.28	6.16	0.56	Arena	40	
8 Cuilapam	5.40	1.275	87.28	6.16	6.56	Arenoso franco	50	
20 CIIDIR	6.76	1.338	78.00	12.16	9.84	Arenoso franco	50	
24 Lachigoló, Tlacolula	8.00	1.848	36.00	31.08	32.92	Franco arcilloso	90	
25 San Dionisio Ocoatepec	8.08	2.358	26.00	41.44	32.56	Arcilloso	80	
40 Sta. Inés, Ayoqueco	6.08	1.083	89.28	6.16	4.56	Arena	40	
47 Los Ocotes, Ejutla	6.73	1.466	75.28	16.16	8.56	Franco arenoso	60	
50 Los Ocotes, Ejutla	7.35	1.721	43.28	34.16	22.56	Franco arcilloso	70	
Método Utilizado	Potenciómetro	Walkey y Black	Boyucous					

Anexo 6.- Análisis de correlación de Pearson entre las variables: porcentaje de mortalidad de larvas (% de mort.), pH, materia orgánica (mat. org.), arena, arcilla y limo.

	% de mort	pH	mat. org.	arena	arcilla	limo
% de mort.	1.00000 0.0000	0.78658 0.0070	0.92691 0.0001	- 0.91013 0.0003	0.88726 0.0006	0.90297 0.0003
pH	0.78658 0.0070	1.00000	0.71376 0.0204	- 0.82155 0.0036	0.84926 0.0019	0.75697 0.0112
mat. org.	0.92691 0.0001	0.71376 0.0204	1.00000	- 0.87629 0.0009	0.87153 0.0010	0.84866 0.0019
arena	- 0.91013 0.0003	- 0.82155 0.0036	- 0.87629 0.0009	1.00000	- 0.98564 0.0001	- 0.97919 0.0001
arcilla	0.88726 0.0006	0.84926 0.0019	0.87153 0.0010	- 0.98564 0.0001	1.00000	0.93087 0.0001
limo	0.90297 0.0003	0.75697 0.0112	0.84866 0.0019	- 0.97919 0.0001	0.93087 0.0001	1.00000