

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

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

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

(PRODUCCIÓN Y PROTECCIÓN VEGETAL)

**MEJORAMIENTO A LA TOLERANCIA AL CALOR Y A LA
DESECACIÓN DE TRES NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
PRESENTA

FERNANDO RUIZ CARBALLO



Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca.

Enero de 2009

LA PRESENTE TESIS TITULADA “MEJORAMIENTO A LA TOLERANCIA AL CALOR Y A LA DESECACIÓN DE TRES NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS”, FUE REALIZADA GRACIAS AL FINANCIAMIENTO POR LA SIP DEL IPN A TRAVÉS DEL PROYECO SIP 20071210.



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 10 del mes de diciembre del 2008 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: "Mejoramiento a la tolerancia al calor y a la desecación de tres nematodos entomopatógenos".

Presentada por el alumno


Ruiz Apellido paterno	Carballo materno	Fernando nombre(s)
		Con registro: B 0 6 1 4 2 0

aspirante al grado de: **MAESTRÍA 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

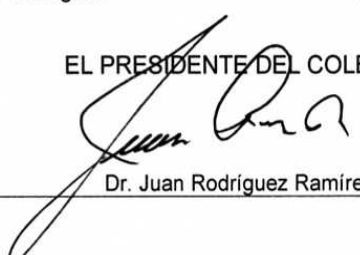

Dr. Celerino Robles Pérez


Dr. José Antonio Sánchez García


Dr. José Cruz Carrillo Rodríguez


Dr. Rafael Pérez Pacheco

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO


Dr. Juan Rodríguez Ramírez





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez el día 13 del mes diciembre del año 2008, el (la) que suscribe Ruiz Carballo Fernando alumno (a) del Programa de **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES** con número de registro **B061420**, 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: **“Mejoramiento a la tolerancia al calor y a la desecación de tres nemátodos entomopatógenos”**., 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 fermarplo79@hotmail.com . Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



RUIZ CARBALLO FERNANDO



INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL
CIDR-UNIDAD-CALSA

RESUMEN

Los nematodos entomopatógenos poseen potencial como agentes ideales de control biológico, sin embargo, la temperatura ambiental y la poca actividad de agua (A_w) restringen su uso. Los objetivos del presente estudio fueron generar líneas tolerantes al calor y a la desecación en tres especies de nematodos entomopatógenos (*Steinernema glaseri*, *Steinernema riobrave*, *Heterorhabditis bacteriophora*). Los nematodos se reprodujeron en larvas de *Galleria mellonella* en laboratorio, después de una semana de almacenaje a 8° C, fueron expuestos a diferentes temperaturas y actividades de agua. Los tratamientos para selección por tolerancia al calor fueron aplicados de la F1 a la F6, aplicando temperaturas de 25, 30 y 35° C por 48 h para selección por resistencia a la desecación se les aplicaron actividades del agua de 0.86, 0.90, 0.97 para las mismas generaciones, también por 48 h a medida que la A_w fue menor, la sobrevivencia de los nemátodos disminuyó, después de la F3 *Steinernema glaseri* fue el que acumuló más tolerancia a la desecación, seguido por *Steinernema riobrave*. Después de la generación F3, las tres especies de nematodos incrementaron su tolerancia a las altas temperaturas, especialmente *Steinernema glaseri* y *Heterorhabditis bacteriophora*, los cuales alcanzaron sobrevivencias del 80 y 70 % a 35° C, respectivamente, en la F6. En la evaluación de las líneas generadas con larvas de segundo estadio de *Phyllophaga vetula* sobresalieron por su tolerancia a bajos A_w 's *Heterorhabditis bacteriophora* y *Steinernema riobrave*, mientras que por su tolerancia a altas temperaturas sobresalieron *Steinernema riobrave* y *Steinernema glaseri*. En la evaluación de las líneas generadas utilizando larvas de *Galleria mellonella* sobresalieron *Steinernema riobrave* y *Steinernema glaseri* por su capacidad de control a alta temperatura (35° C) mientras que *Heterorhabditis bacteriophora* y *Steinernema riobrave* mostraron buena capacidad de control a baja actividad del agua ($A_w = 0.86$). Tomando en cuenta su capacidad para controlar tanto larvas de *Phyllophaga vetula* como de *Galleria mellonella*, *Steinernema glaseri* fue el mas efectivo a altas temperaturas, mientras que *Heterorhabditis bacteriophora* tuvo mejor capacidad de control a A_w bajos.

Palabras clave: *Steinernema riobrave*, *Steinernema glaseri*, *Heterorhabditis bacteriophora*, A_w .

ABSTRACTS

Entomopathogenic nematodes possess attributes as ideal biological control agents, however, the ambient temperatures and low water activity (A_w) may restrict its use. The objectives of this study were to generate lines with tolerance to heat and desiccation in three entomopathogenic nematodes (*Steinernema glaseri*, *Steinernema riobrave* and *Heterorhabditis bacteriophora*). The nematodes were reproduced in *Galleria mellonella* larvae in laboratory conditions; after a week of storage at 8° C, the nematodes were exposed to different temperatures and water activities. Treatments for selection for heat tolerance were applied to from the generations F1 to F6, applying temperatures of 25°, 30° and 35° C for 48 h for selection for resistance to desiccation water activities of 0.86, 0.90 and 0.97 were applied for the same generations, also for 48 h as the A_w decreased, the survival of all nematodes was diminished, but after generation F3 *Steinernema glaseri* was the one which accumulated more tolerance to desiccation, followed by *Steinernema riobrave*. After generation F3, all nematode species increased their tolerance to high temperatures, especially *Steinernema glaseri* and *Heterorhabditis bacteriophora*, which in generation F6 reached 80 and 70% survivorship at 35° C, respectively. The evaluation of the desiccation tolerance of the lines, which was done on second stage *Phyllophaga vetula* larvae, showed that *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema riobrave* were the most tolerant to low A_{ws} , while for its tolerance to high temperatures excelled *Steinernema glaseri* and *Steinernema riobrave*. The evaluation of the lines generated on *Galleria mellonella* larvae indicated that *Steinernema glaseri* and *Steinernema riobrave* were outstanding by their ability to control them at high temperature (35° C); while *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema riobrave* showed good control capacity at low water activity. Taking into account their ability to control both *Phyllophaga vetula* and *Galleria mellonella* larvae, *Steinernema glaseri* would be the most effective at high temperatures, while *Heterorhabditis bacteriophora* had a better capacity of control at lower A_{ws} .

Key words: *Steinernema riobrave*, *Steinernema glaseri*, *Heterorhabditis bacteriophora*, A_w .

AGRADECIMIENTOS

Al CIIDIR Unidad OAXACA por facilitar su infraestructura para la realización de mi tesis y contribuir a mi formación como Maestro en Ciencias.

Al CONACYT, por haberme otorgado la beca durante un año, para mi formación académica.

A PIFI, por haberme otorgado la beca durante tres semestres.

Al Dr. Jaime Ruiz Vega, por haber aceptado ser mi Director de tesis y su apoyo para la realización de ésta, además de haberme transmitido sus conocimientos.

Al Dr. Celerino Robles Pérez, por haber sido mi Consejero de estudios desde el inicio de mi tesis hasta el final del mismo, y por ser miembro de mi comité revisor.

Al Dr. José Antonio Sánchez García, por el apoyo que me brindó durante mis cursos en la Institución y por ser uno de los revisores de mi tesis.

Al Dr. Rafael Pérez Pacheco, por el apoyo que me dio y la confianza durante la realización de mi tesis y por ser uno de los revisores de mi tesis.

A la Dra. Martha Angélica Bautista Cruz, por la amistad que me dio en la Institución y por ser integrante de mi comité de tesis.

Al M. en C. Teodulfo Aquino Bolaños, por aconsejarme en la realización de mi tesis.

Al M. en C. Sabino Honorio Martínez Tomas, por el apoyo que me brindo en la realización de los análisis estadísticos de la presente tesis.

Al Dr. José Cruz Carrillo Rodríguez, por haber sido uno de mis revisores.

Al M. en C. Sergio Girón Pablo, por haberme apoyado en mi tesis y haberme brindado su amistad.

A la M. en C. Niurka Mena Mesa, por haberme apoyado en mi tesis y haberme brindado su amistad.

Al M. en C. Miguel Ángel Cruz Sánchez, por haberme brindado su amistad y sus concejos en los cursos.

Al Ing. Julián Hernández Cruz, por el apoyo en el laboratorio y su amistad.

Al Lic. Juan Carlos Dominguez Revuelta, por el apoyo en la realización de mi tesis y por ser un gran amigo.

A todos y cada una de las personas que me brindaron apoyo para la realización de mi tesis...

¡ MUCHAS GRACIAS ¡

DEDICATORIA

A mis padres Plotino Ruiz Chiñas y Leticia Carballo Orozco, por que los amo y se que darían la vida por mi, que siempre estarán orgullosos de mi, y por haberme hecho un hombre de bien.

A mi esposa Maria del Rosario Guillen Calderón e hijos Maria Fernanda Ruiz Guillen, Plotino Ruiz Guillen y April Benita Ruiz Guillen por el amor que siempre han brindado.

A mi hermano Arturo por el apoyo y consejo que me brindo durante mi realización de mi maestría

A mi hermanito Plotino Ruiz Carballo, por ser siempre su ejemplo a seguir.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	i
ABSTRACTS	ii
ÍNDICE DE CUADROS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
CAPITULO I. INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO II. OBJETIVOS	4
2.1. Objetivo general.....	4
2.2. Objetivos específicos.....	4
CAPÍTULO III HIPÓTESIS	5
CAPITULO IV. REVISIÓN DE LITERATURA	6
4.1. Control biológico.....	6
4.2. Los nematodos entomopatógenos (NE's).....	7
4.2.1. Distribución geográfica de los NE's.....	8
4.2.2 Taxonomía de los nematodos.....	9
4.2.3. Características morfológicas de los NE's.....	10
4.2.4. Biología y hábitos de los NE's.....	15
4.2.5. Bacterias simbiotes de NE's.....	23
4.2.6. Hospederos de los NE's.....	25
4.2.7. La temperatura en el desarrollo de los NE's.....	27
4.2.8. Enemigos naturales de los NE's.....	28
4.2.9. Competencia inter e intraespecífica en los NE's.....	30
4.2.10. Compatibilidad de los NE's con otros microorganismos.....	32
4.3. Ciclo de vida y conducta de la <i>Phyllophaga</i>	33
4.3.1. Taxonomía de <i>Phyllophaga</i>	35
CAPITULO V. MATERIALES Y METODOS	36
5.1. Área de estudio.....	36
5.2. Crianza del nematodo.....	37
5.3. Mantenimiento de la colonia de <i>Galleria mellonella</i>	38
5.4. Nematodos.....	40

5.5. Procedimiento experimental.....	41
5.5.1. Tratamiento térmico.....	41
5.5.2. Cosecha de los nematodos.....	41
5.5.3. Generación de líneas tolerantes a la desecación. Experimento 1.....	42
5.5.4. Generación de líneas con Tolerancia al calor. Experimento 2.....	43
5.5.5. Experimentos para la evaluación de la tolerancia adquirida.....	44
5.5.5.1 Evaluación de la tolerancia a baja A_w . Experimento 3.....	45
5.5.5.2 Evaluación de la tolerancia a temperaturas altas. Experimento 4.....	47
CAPITULO VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	48
6.1. EXPERIMENTO 1. Generación de las líneas resistentes a alta temperatura.....	48
6.1.1. <i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	48
6.1.2. <i>Steinernema riobrave</i>	49
6.1.3. <i>Steinernema glaseri</i>	50
6.2. Experimento 2. Generación de líneas tolerantes a la desecación.....	51
6.2.1. <i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	51
6.2.2. <i>Steinernema riobrave</i>	53
6.2.3. <i>Steinernema glaseri</i>	54
6.3. Experimento 3. Evaluación de la capacidad de control de larvas de <i>Phyllophaga vetula</i> de las líneas generadas.....	55
6.3.1. Evaluación a temperatura alta (35° C).....	55
6.3.2. Evaluación con baja actividad de agua (A_w de 0.86).....	56
6.4. Experimento 4. Evaluación de la capacidad de control de las líneas generadas en larvas de <i>Galleria mellonella</i>	58
6.4.1. Evaluación a alta temperatura (35° C).....	58
6.4.2. Evaluación con baja actividad de agua (A_w de 0.86).....	60
CAPITULO VII. CONCLUSIONES.....	62
CAPITULO VIII. LITERATURA CITADA.....	64

INDICE DE CUADROS

1	Líneas de nematodos tolerantes evaluados a una Temperatura de 35° C, utilizando larvas de <i>G. mellonella</i> y <i>P. vetula</i>	45
2	Líneas de nematodos tolerantes evaluados a un A_w de 0.86, utilizando larvas de <i>G. mellonella</i> y <i>P. vetula</i>	45
3	Análisis de varianza del experimento con larvas de <i>P. vetula</i> a 35°C.....	55
4	Mortalidad de <i>P. vetula</i> por especie de nematodos a 35° C.....	56
5	Análisis de varianza del experimento con larvas de <i>P. vetula</i> a un A_w de 0.86.....	57
6	Mortalidad de <i>P. vetula</i> ciega por especie de nematodos a un A_w de 0.86.....	58
7	Análisis de varianza del experimento con larvas de <i>G. mellonella</i> a una temperatura de 35° C.....	59
8	Mortalidad de <i>G. mellonella</i> por especie de nematodos a 35° C.....	59
9	Análisis de varianza del experimento con larvas de <i>G. mellonella</i> a un A_w de 0.86.....	60
10	Mortalidad de <i>G. mellonella</i> por especie de nematodos a un A_w de 0.86.	61

INDICE DE FIGURAS

1	Ciclo de vida de los NE's (Tomado de Dirt Works, 2001).....	16
2	Larvas muertas por NE's a) <i>Steinernema glaseri</i> , b) <i>Steinernema riobrave</i> c) <i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	25
3	Ciclo de vida anual de la "gallina ciega" (<i>Phyllophaga</i> sp.) (Tomado de Entomology, 2000).....	34
4	Colecta de la gallina ciega <i>P. vetula</i>	37
5	Paneras donde se criaron las larvas de <i>G. mellonella</i>	39
6	Dieta homogenizada para larvas de <i>G. mellonella</i>	40
7	Agua destilada para tratamiento térmico.....	41
8	Trampa White.....	42
9	Larvas de <i>G. mellonella</i> inoculadas con NE's a un A_w de 0.86.....	43
10	Aplicación de tratamiento de calor para el proceso de selección.....	44
11	Grafica que relaciona la actividad de agua con el porcentaje de humedad en caja petri.....	46
12	Larvas de <i>P. vetula</i> expuestas con nematodos tolerantes a un A_w de 0.86.....	46
13	Porcentaje de sobrevivencia del nematodo <i>H. bacteriophora</i> a diferentes temperaturas.....	49
14	Porcentaje de sobrevivencia del nematodos <i>S. riobrave</i> a diferentes temperaturas.....	50
15	Porcentaje de sobrevivencia del nematodos <i>S. glaseri</i> a diferentes temperaturas.....	51
16	Porcentaje de sobrevivencia del nematodos <i>H. bacteriophora</i> a diferentes A_w	52
17	Porcentaje de sobrevivencia del nematodos <i>S. riobrave</i> a diferentes A_w	53
18	Porcentaje de sobrevivencia del nematodos <i>S. glaseri</i> a diferentes A_w	54

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

En México son pocas las experiencias documentadas sobre el uso de nematodos como agentes de control biológico de insectos plaga. Los trabajos existentes se han enfocado a dos líneas de investigación: una que involucra la búsqueda de nuevos aislamientos, y otra, principalmente con plagas de suelo, que ha consistido en pruebas de campo para determinar la efectividad de especies de *Steinernema* y *Heterorhabditis* que se producen de manera comercial (Alatorre, 1999).

Los nematodos entomopatógenos (NE's) de las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae son parásitos obligados en la naturaleza, ya que requieren de un hospedero adecuado para completar su ciclo. Para matarlo utilizan bacterias que coexisten en simbiosis. El tercer estadio emerge del cadáver del hospedero y puede permanecer por meses en el suelo hasta que encuentra un nuevo hospedero (Kaya y Koppenhofer, 1996).

El éxito al utilizar NE's para controlar plagas depende de una serie de factores, incluyendo compatibilidad con la plaga y el ambiente, alta virulencia, persistencia y capacidad de búsqueda. La reproducción de los NE's en laboratorio puede afectar dichos atributos debido a procesos que incluyen erosión genética, endogamia o selección involuntaria. Una alternativa para prevenir el deterioro de

dichos atributos es la formación de líneas genéticamente uniformes (Gaugler, 2004).

De acuerdo a Segal y Glazer (2000), la genética es una herramienta poderosa para incrementar los atributos benéficos de los NE's. Los métodos de mejoramiento incluyen: selección por tolerancia a estreses, cribado de aislados naturales para resistencia a calor, hibridización y mutagénesis, para lo cual la ingeniería genética es la mejor alternativa.

El futuro de los NE's como insecticidas biológicos es excelente. Los nematodos tienen algunas ventajas como agentes de control sobre los plaguicidas químicos, no contaminan y son seguros para el medio ambiente, a tal grado que están exentos de registro por parte de la Agencia de Protección del Medio Ambiente (APMA) de los E. U. (Cabanillas, 1999).

Alatorre y Guzmán (1999), mencionan que los nematodos entomopatógenos tienen ciertas ventajas sobre los insecticidas químicos. Por ejemplo, estos organismos son ambientalmente seguros y aceptables y buscan activamente a su huésped; debido a esta característica, han demostrado tener una alta capacidad en el control de insectos barrenadores y algunas plagas del suelo.

El uso extensivo de los nematodos entomopatógenos está limitado por su susceptibilidad a factores como la desecación, siendo una de las formulaciones más efectivas la que incluye a los nematodos en latencia en minerales arcillosos.

Si los nematodos fueran más tolerantes a la desecación, podrían prolongar su viabilidad por mas tiempo (Strauch *et al.*, 2004).

La baja tolerancia de los nematodos entomopatógenos a contenidos de agua menores a una A_w de 0.86 impide su utilización a nivel comercial y reduce su efectividad para el control de plagas en condiciones de campo. Por consiguiente, se realizó un proceso de selección de especies de nematodos por su tolerancia a baja actividad del agua. Además, se evaluaron dichos nematodos por su capacidad de control de larvas de *Phyllophaga vetula* bajo dos condiciones de humedad en experimentos de laboratorio.

En la agricultura mexicana, el uso generalizado de los nematodos para el control de insectos se ha visto limitado, principalmente por la falta de disponibilidad en el mercado nacional de productos formulados a base de estos organismos entomopatógenos (Alatorre, 1999).

El objetivo final fue producir una cepa a base de NE's con mayor efectividad para el control de plagas del suelo en condiciones de baja humedad y altas temperaturas.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Mejorar la tolerancia al calor y a la desecación de tres nematodos entomopatógenos (NE's): *Heterorhabditis bacteriophora*, *Setinernema riobrave* y *Steinernema glaseri*.

2.2. Objetivos específicos

1. Generar una línea de NE's resistentes a la desecación.
2. Generar una línea de NE's resistentes al calor.
3. Evaluar la resistencia de las líneas de NE's tolerantes a baja actividad de agua en larvas de *Phyllophaga vetula*.
4. Evaluar la resistencia de las líneas de NE's tolerantes a altas temperaturas en larvas de *Phyllophaga vetula*.
5. Evaluar la resistencia de las líneas de NE's tolerantes a baja actividad de agua en larvas de *Galleria mellonella*.
6. Evaluar la resistencia de las líneas de NE's tolerantes a temperaturas altas en larvas de *Galleria mellonella*.

CAPÍTULO III

HIPÓTESIS

1. La exposición de nematodos a valores de actividad del agua (A_w) menores a 1.0 permitirá seleccionar individuos con mayor tolerancia a la desecación.
2. La exposición del nematodo a temperaturas altas permitirá identificar individuos con mayores posibilidades de sobrevivir en ambientes cálidos.
3. Las líneas generadas son más eficientes para el control de larvas de *Phyllophoga vetula* y *Galleria mellonella* bajo condiciones de alta temperatura y baja humedad.

CAPÍTULO IV

REVISIÓN DE LITERATURA

4.1. Control biológico.

El control biológico clásico se define típicamente como el proceso mediante el cual se controla plagas no nativas con especies importadas, frecuentemente antagonistas del lugar de origen de la plaga (Myers *et al.*, 1994), mientras que el término control biológico neoclásico se refiere a la introducción de un antagonista de una especie nativa (Simberloff y Stiling, 1996).

Este tipo de control se basa en el principio, que todos los insectos son depredados o sirven de hospederos para otras formas de vida, por lo tanto los enemigos naturales de los insectos son: depredadores, parásitos o patógenos (Myers *et al.*, 1994), Esta diversidad de enemigos naturales de insecto incluye vertebrados, así como otros invertebrados como insectos mismos, microorganismos y nematodos (Pedigo, 1996).

Los NE's de la familia Steinernematidae y Heterorhabditidae aumentan el número de opciones de control biológico de insectos, especialmente de aquellos que habitan en el suelo (Lacey y Goettel, 1995).

El control biológico es un conjunto de teorías que tienden a hacer uso de organismos que causen problemas al alimento, la salud y la vivienda del hombre.

4.2. Los nematodos entomopatógenos (NE's)

Los NE's son parásitos obligados de insectos (Koppenhofer y Kaya, 1997) considerados como agentes potenciales de control biológico (Alatorre y Kaya, 1990; Peters, 1996). Las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae, presentan actualmente un gran interés; los NE's de estas familias están asociadas simbióticamente con la bacteria de los géneros *Xenorhabdus* y *Photorhabdus*, respectivamente (Gaugler y Kaya, 1990; Akhurst y Dunphy, 1993; Kaya y Gaugler, 1993; Simoes y Rosa, 1996; Kaya y Koppenhofer, 1996).

Los NE's se caracterizan por: a) llevar consigo una bacteria que regurgitan en la cavidad del cuerpo del insecto, b) presentar un amplio rango de hospederos que incluyen a la mayoría de las órdenes y familias de insectos y 3) se pueden criar a gran escala en medios artificiales líquidos o sólidos. Además, poseen otras características como; eliminar a los insectos a las 48 h. de penetrar en ellos, sobreviven por períodos largos en condiciones de almacenaje y se aplican con métodos convencionales, además de persistir en el ambiente natural (Poinar, 1990).

En la actualidad, los NE's son organismos con características propias, que se pueden utilizar en diversos sistemas agrícolas para el control de insectos plaga, con expectativas de éxito.

4.2.1. Distribución geográfica de los NE's

Los NE's se encuentran en gran parte del mundo, se les ha localizado en todos los continentes, excepto en la Antártida (Kaya, 1987); así como de regiones subárticas hasta climas tropicales (Poinar, 1990; Liu y Berry, 1995^a; Hominick *et al.*, 1996); en las regiones muy frías, han tenido la capacidad de establecerse en condiciones de temperatura bajo cero, como es el caso de algunos Steinternematidos aislados de regiones de Canadá (Mracek y Webster, 1993). De igual manera se ha aislado de regiones áridas, como el desierto de Negev en Israel (Glazer *et al.*, 1993).

Los NE's *Steinernema glaseri* y *Heterorhabditis bacteriophora* se encontraron muestras en España. Este es el primer reporte de la presencia de *S. glaseri* fuera de las regiones neárticas y neotropical (región Palearctica) (Agüera y Gabarra, 1994). En este mismo país García y Palomo (1996), aislaron cinco tipos distintos morfológicos de steinternematidos: *Steinernematidae carpocapsae*, *Steinernema filitiae* y otras dos especies de género, además de *Heterorhabditis bacteriophora*.

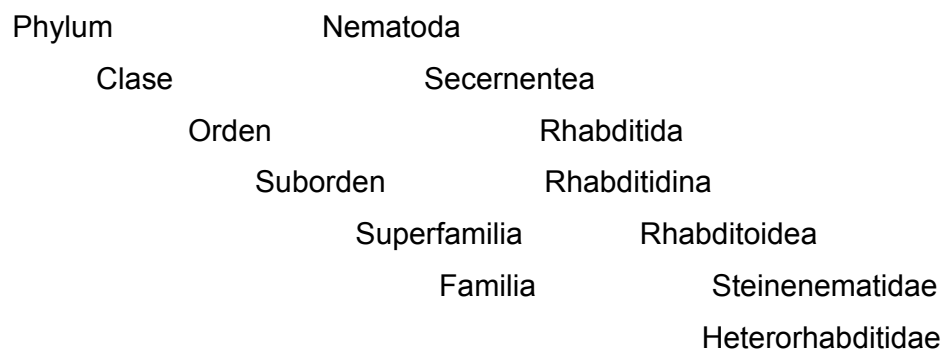
En estudio similar que se desarrolló en Oregón, EE.UU, se encontraron a NE's del genero *Heterorhabditis* en 10 sitios, y a *Steinernema* en cinco sitios, además se encontró una asociación significativa entre región geográfica, hábitats, textura del suelo y género de nematodo recuperado. En latitudes mayores de Oregón se recuperó mayor cantidad de nematodo del género *Heterorhabditis* que de *Steinernema*, por lo que la región geográfica y la textura del suelo pueden ser los

factores más importantes que influyen en la distribución natural de *Heterorhabditis* spp. (Liu y Berry, 1995b).

En un estudio llevado a cabo en Tennessee, EE.UU., se observó la presencia de *H. bacteriophora* y *S. carpocapsae* al utilizar larvas de diferentes insectos como cebo (Rueda *et al.*, 1993). Mientras que en Alaska, Columbia Británica y el territorio de Yuko, durante los meses de verano, se encontraron a *S. feltiae* y *Steinernema* spp., así como *H. megidis*. La mayoría de los NE's se encontraron en lugares donde la ingestación de insectos es visible y la influencia del hombre en los hábitats es substancial (suelo agrícola, poblados de árboles, etc.) ninguno se encontró en pastizales y selvas vírgenes (Mracek y Webster, 1993).

4.2.2. Taxonomía de los nematodos

La ubicación taxonómica de las familias de NE's de acuerdo a Blaxter *et al.*, (1998), es:



La familia Steinernematidae contiene al género *Steinernema* que presenta las especies; *S. cubanum*, *S. erenarium*, *S. puertoricense*, *S. longicaudum*, *S. rarum*, *S. ritteri*, *S. scapterisci*, *S. carpocapsae*, *S. kushidai*, *S. riobrave*, *S. S. bicornotum*,

S. ceratophrum, *S. neocurtillae*, *S. affine*, *S. intermedium*, *S. feltiae* y *S. kraussei*, además del género *Neosteinerinema* con la especie *longicurvicauda*. Mientras que la familia Heterorhabditidae contiene al género *Heterorhabditis* con las especies; *H. megidis*, *H. brevicaudus*, *H. hawaiiense*, *H. argentinense*, *H. indica*, *H. marelatus*, *H. bacteriophora* y *H. zealandica* (Hominick *et al.*, 1997).

Las características principales consideradas en claves taxonómicas para la identificación de NE's son: cápsula cefálica, región caudal, especula, testículos y gobernaculo del macho (Nguyen y Smart, 1992^a; Nguyen y Smart 1993^a; Glazer *et al.*, 1993; Stock y Kaya, 1996; Nguyen y Smart 1996).

Los NE's, a menudo difieren en características biológicas y de infectividad generando considerable debate acerca de su estado taxonómico (Liu y Berry, 1995a).

La diversidad de géneros y especies de NE's aumenta conforme se incrementa el numero de investigaciones con estos organismos, lo cual obliga a estudiosos de la biosistemática a desarrollar estudios, que permitan la ubicación y/o reubicación de los NE's en la taxa correspondientes.

4.2.3. Características morfométricas de los NE 's

Las medias morfométricas de la especula, gobernáculo, longitud transversal del cuerpo, distancia desde el fin anterior al poro excreto x100 (D%), longitud de la especula dividida por lo ancho del cuerpo anal (SW), longitud del gobernáculo

dividida entre longitud de la especlusa (GS) de machos de los géneros *Steinernema*, *Neosteinerema* y *Heterorhabditis* de la primera generación se usan para identificar las especies (Nguyen y Smart, 1996).

La especie *S. scapterisci* aislada en Uruguay de *Scapteriscus vicinus* se distingue de otros miembros de su género por la presencia de una estructura prominente de forma elíptica asociada con el canal excretor, además de las espículas del macho que están punteadas (Nguyen y Smart, 1990).

En la morfometría de los juveniles infecciosos de *Steinernema* spp., provenientes de cultivos *in vivo*, especialmente la longitud del cuerpo, varía significativamente con el tiempo de cosecha. Para lo cual sugiere coleccionar los juveniles infecciosos después de una semana posterior a su primera emergencia del cadáver. Es probable que la reducción de los juveniles infecciosos sobre el tiempo del cultivo *in vivo* esté relacionado con la disminución de reservas en el cadáver (Nguyen y Smart, 1995).

El uso de medidas del cuerpo en nematodos cultivados *in vitro*, difieren de las medidas originales de los cultivados *in vivo*, así la longitud media del cuerpo para *S. anomali* es de 1,165 μm cultivados *in vivo*, contra 993 μm cultivado *in vitro*; en *S. feltiae* 843 μm contra 632; en *S. riobrave* 602 μm contra 457 μm , para *S. scapterisci* 536 μm contra 482 μm . Se sugiere no utilizar las medidas del cuerpo de juveniles infecciosos cultivados *in vitro* para propósito de identificación o taxonomía (Nguyen y Smart, 1995).

Las hembras de *Steinernema* presentan seis papilas labiales prominentes, cuatro papilas cefálicas, y una pequeña anfidia. La cola es más corta que la mitad del cuerpo al año. El macho tiene 6 papilas labiales y 4 papilas cefálicas largas, mismas que no están descritas para otros machos de *Steinernema*; presentan 11 y 12 (si están presentes) pares de papilas genitales que no están reportadas en la descripción original. El tercer estado juvenil (infeccioso) tiene una cabeza lisa, cuerpo anillado, seis papilas labiales pronunciadas, cuatro papilas cefálicas y un elevado disco oral (Nguyen y Smart, 1992^a).

Mientras que la especie *S. neocurtillis* aislado de *Neocultilla hexadactyla* Petra se distingue de otros miembros del género por características del macho del tercer estado juvenil de la primera generación. En el macho la distancia del extremo anterior al poro excretor es menor que lo ancho del cuerpo al poro excretor. La longitud del gobernáculo es más grande que tres cuartas partes de la longitud de la espícula. En los juveniles infecciosos la distancia del extremo anterior al poro excretor es extremadamente corta (18 μ m) Así, el promedio de la longitud del cuerpo es de 885 μ m (Nguyen y Smart, 1992c).

Las especies del nematodo *S. cubana* así como *S. glaseri* y *S. anomali* constituyen un grupo morfológicamente muy estrecho por la relación entre sus especies. Sin embargo, no se han observado cruzamientos fértiles entre estas especies. *S. cubana* puede ser separada de todas las especies excluyendo *S. glaseri* y *S. anomali* por la longitud de su cuerpo; los juveniles infecciosos miden 1.238 mm, mientras que los infecciosos de otras especies descritas son menores de 1.0 mm, además de la morfología de los espiráculos (Mracek *et al.*, 1994).

Los machos de *S. anomali* presentan seis labios y cuatro papilas cefálicas prominentes, así como anfibias pequeñas. Además de presentar 11 a 14 pares de papilas genitales, de éstas, seis a nueve son preanales y subventrales, un par prenal lateral, un par anal y tres pares postanales. Las espículas poseen una cabeza corta de hoja delgada y fuste reducido. El fin distal es alargado con una apertura dorsal. El gobernáculo es más corto que las espículas, el cuneo del gobernáculo corto y bifurcado anteriormente. Las hembras tienen seis labios, cuatro papilas labiales y pequeñas anfideas, la vulva presenta un labio posterior engrosado. Los juveniles infecciosos poseen una cabeza lisa, anfideas prominentes y 4 papilas cefálicas, que no son evidentes (Nguyen y Smart, 1993b).

De igual forma, las exploraciones en el microscopio electrónico revelan la localización del fasmido en los juveniles infecciosos de *S. glaseri*, el cual se localiza en el 40% de la longitud posterior de la cola al ano y algunas veces esta cubierto por exudados (Nguyen y Smart, 1993a)

El nematodo *S. monticolum* colectado en Corea, difiere de otros miembros del género por la longitud de la cola en los adultos, la forma, así como la longitud de la espícula y del gobernáculo del macho, además de la disposición de las papilas genitales. Mientras que el juvenil infeccioso se distingue de otras especies por lo ancho del cuerpo y el valor del radio (longitud total dividida entre el valor más amplio del cuerpo) (Stock *et al.*, 1997)

Un estudio con heterorhabditidos muestra que los machos de una misma generación presentan 950 μm de longitud, con una distancia de 152 μm a la base

del esófago y 150 μm al poro excretor. La longitud de la espícula es de 42 μm y presenta nueve pares de papilas genitales. Los juveniles infecciosos miden una longitud aproximada de 600 μm y mostraron los surcos longitudinales típicos en la exocutícula de L2 y un gancho distintivo sobre la cabeza (Glare *et al.*, 1993).

Los juveniles pre-parasíticos (J2) e invasores (J3) de la familia Heterorhabditidae poseen una ornamentación característica en la cutícula. En el J2 la cabeza y la región cervical presentan una red de surcos longitudinales y transversales que se extienden aproximadamente una cuarta parte de la longitud del cuerpo, a partir de entonces líneas continuas y surcos longitudinales se extiende hasta la cola, mientras que la cutícula de los J3 presentan dos crestas distintivas en la región lateral (Mracek *et al.*, 1991).

Por los machos de *Heterorhabditis*, el reflejo de los testículos y la longitud total son las variables que más contribuyen en la distinción entre especie, y para los juveniles infecciosos, las variables que más contribuyen son: la longitud de la cola y la longitud total. Esta característica morfométrica son provechosas y confiables en la identificación de especies de éste género (Stock y Kaya, 1996).

El nematodo *H. hawaiiense* difiere de otras especies de *Heterorhabditis* por la longitud del juvenil infeccioso, y las características morfológicas de la espícula, gobernáculo, y bursa. La ampliación de segmentos al azar de DNA (RADP) muestra como esta especie presenta un patrón genérico distinto, al compararse con las seis especies de *Heterorhabditis* (Gardner *et al.*, 1994).

De igual manera, *H. marelatus* n. sp., difiere de otras especies de *Heterorhabditis* por la longitud del juvenil infeccioso y del gobernáculo, así como la forma de la espícula, bursa y papilas genitales (Liu y Berry, 1996).

Análisis morfológicos y morfométricos, así como de pruebas de cruzamiento indican que *H. hepialus* y *H. marelatus* son especies conespecíficas. No se presentan diferencias significativas entre estas especies, por el contrario, se observan similitudes en la forma, longitud y anchura de la espícula, así como el gobernáculo de los machos, además las pruebas de cruzamiento muestran la producción de progenie fértil y confirman las observaciones morfológicas y morfométricas. Por lo que *H. hepialus* se considera un sinónimo subalterno de *H. marelatus* (Stock, 1997).

Si bien, el tamaño de las estructuras y regiones son importantes para la determinación de las especies de NE's, no menos importantes son las condiciones en que se lleva a cabo la morfometría, como son; el tipo de medio en el cual se desarrollan los juveniles infecciosos, los tiempos transcurridos después de la primer emergencia y después de ser colectados. Sin embargo, en la actualidad se requiere en la mayoría de los casos, el uso de técnicas moleculares como son los estudios de ADN que permitan certidumbre a los estudios morfométricos.

4.2.4. Biología y hábitos de los NE's

Como resultado de una evolución paralela, los NE's presentan patrones básicos de

similitud en su biología (Poinar, 1990). Son parásitos obligados de insectos (Figura 1), invaden al hospedero y liberan una bacteria que se multiplica en el hemocele del insecto, donde posteriormente se alimentan y reproducen. El hospedero muere y los nematodos se reproducen y colonizan todo el cadáver y finalmente salen en busca de nuevos hospederos (Jaffee, 1993).

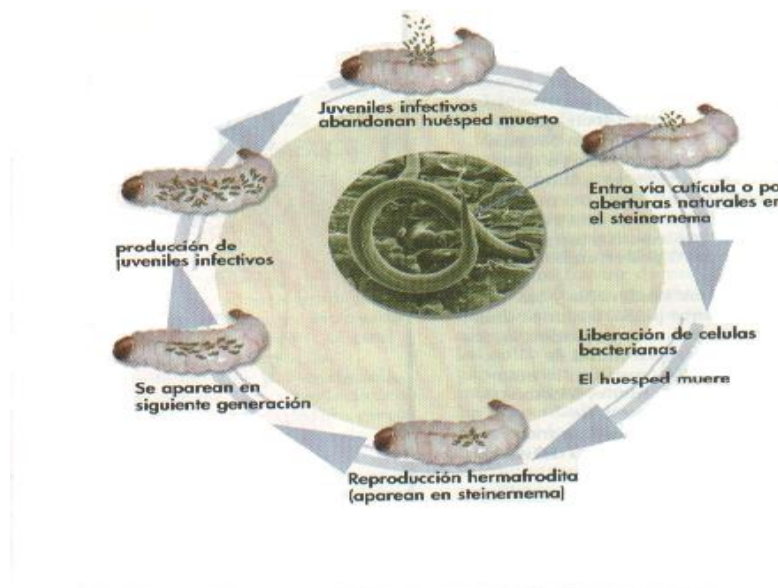


Figura 1. Ciclo de vida de los NE's (Dirt Works, 2001)

El ciclo de vida de los NE's consta de: un estado de huevo, cuatro estadios juveniles y un estadio adulto (macho o hembra). Dicho ciclo puede proceder por dos rutas:

a) sí los nutrientes suministrados son suficientes y la población no presenta un hacinamiento, los juveniles infecciosos se desarrollan hasta llegar a machos y hembras adultas de la primera generación. Muchos huevos de estas hembras adultas eclosionan y los juveniles se desarrollan a través de cada estado de vida,

hasta formar machos y hembras adultas de segunda generación. Este ciclo de vida tarda de ocho a diez días a 24° C (ciclo largo).

b) si los nutrientes son insuficientes o existe un hacinamiento en la población, los juveniles infecciosos se desarrollan hasta llegar a ser machos y hembras adultos de la primera generación y los huevos producidos por las hembras dan origen directamente a juveniles infecciosos, este ciclo tarda de seis a siete días, por lo que se considera ciclo corto (Nguyen y Smart, 1992b).

La duración del ciclo de vida de *H. bacteriophora* a 25° C, de huevo a huevo es de 96 h el desarrollo de juveniles toma un tiempo de 48 h, con la duración de cada estado de 8 a 12 h la duración y proporción de los estados de desarrollo en la población son similares en cultivos *in vivo* que *in vitro* (Zioni *et al.*, 1992). Los ciclos de vida dependen de la temperatura y no se completa a temperaturas inferiores de 10 o 15° C o a temperaturas superiores de 35 a 37° C, siendo la óptima de 24° C (Nguyen y Smart, 1992b).

Los NE's viven dentro del insecto, excepto en una etapa de su vida. El único estado de vida libre, que emerge de un cadáver de un insecto y entra a vivir en otro, es el tercer estado juvenil, conocido como juvenil infeccioso (JI) (Downes y Griffin, 1996).

Los JI's están morfológica y fisiológicamente adaptados a permanecer en el ambiente por períodos largos sin alimentarse, mientras esperan un insecto hospedero. Es el único estado de supervivencia en el ciclo de vida de estos

nematodos, su papel es localizar al hospedero a través de sus anfidias bien desarrolladas, así como de sus papilas (Poinar, 1990). Estos portan al menos al inicio, la cutícula del segundo estado como una vaina o funda y la bacteria simbiote en su intestino (Downes y Griffin, 1996). Los JI's de *S. carpocapsae* incrementan su movilidad, al desprenderse de cutícula ante la presencia de hospederos y su movilidad aumenta hasta tres veces más, aunque también el desprendimiento puede deberse como respuesta del hospedero (Campbell y Gaugler, 1992).

Los JI's de *S. glaseri* después del primer día de emergencia son predominantemente machos, mientras que las proporciones de sexos de los días cuatro y ocho son sesgadas hacia las hembras. En tanto que la proporción de sexos para juveniles infecciosos de *S. carpocapsae* varía significativamente de manera opuesta, las hembras se presentan hasta en un 85 % durante el primer día de emergencia y el 66.97 % en la emergencia del cuarto día (Campbell y Gaugler, 1992).

En *Steinernema*, el JI se desarrolla dentro de hembras sexuales, nunca en hermafroditas, mientras que en *Heterorhabditis* cada JI se desarrolla dentro de hembras hermafroditas y nunca en hembras sexuales. Sin embargo, la segunda generación (progenie de la hembra inicial que dio origen al JI) comprende hembras y machos sexuales, en ambos géneros (Poinar, 1990).

La producción de progenie dentro de los cadáveres de larvas infectadas por nematodos, se origina a los 14 días posteriores a la infección. Los nematodos

heterorhabditidos continúan con la producción de JI's en cadáveres de larvas de *G. mellonella* después de 15 y hasta 46 días (Mannion y Jansson, 1992a).

Los NE's presentan dos tipos diferentes de estrategia para cazar insectos, una es la de emboscar y otra es buscar los huéspedes, las habilidades para descubrir hospederas son poco conocidas, a pesar de ser fundamentales en su éxito como agentes de control biológico en el suelo (Lewis, *et al*, 1992; Grewal *et al*, 1996; Kaya y Koppenhofer, 1996; Downes y Griffin, 1996; Gaugler *et al*, 1997). Los emboscadores como *S. carpocapsae* y *S. scapterisci* tienden a permanecer en posición recta sobre su cola (Campbell y Gaugler, 1992); responden pobremente a compuestos volátiles liberados por los hospederos, mientras que los buscadores de hospederos como *S. glaseri* y *H. bacteriophora* presentan una gran movilidad y responden a olores del hospedero que puede localizarlo a largas distancias (Lewis *et al*, 1992).

El comportamiento de los juveniles infecciosos varía de especie a especie, así por ejemplo *S. carpocapsae* tiende a buscar insectos sobre la superficie del suelo y pueden ser vistos parados sobre su cola agitándose hacia atrás y hacia adelante o inclinándose para saltar, o se desplaza formando un puente entre partículas de suelo, mientras que las especies más grandes de *Steinernema*, como *S. glaseri* y *S. anomali*; así como los heterorhabditidos tienden a dispersarse a través del suelo en busca de sus hospederos (Poinar, 1990).

Algunas especies de nematodos presentan como un comportamiento normal el saltar, sobre todo en la etapa de juvenil infeccioso, esta acción se relaciona con la

localización del hospedero. La dirección del salto es de acuerdo a la orientación y proximidad del insecto. El salto se inicia cuando el nematodo está parado sobre su cola y dobla rápidamente su región anterior de su cuerpo, hasta que la cabeza haga contacto con la región ventral de su cuerpo y en esa posición toma el impulso para saltar. La fuerza generada por este mecanismo es suficiente para impulsarse un promedio de 4.8 ± 0.8 mm (nueve veces la longitud del nematodo). Este comportamiento se da principalmente en nematodos emboscadores que esperan el paso del hospedero potencial para saltar sobre ellos (Campbell y Kaya, 1999).

Los nematodos *H. bacteriophora* y *S. glaseri* son más infecciosos para larvas que presentan poco o nulo movimiento por ser especies de nematodos buscadores de hospederos, sin embargo *S. feltiae* y *S. riobrave* poseen una estrategia intermedia ya que tienen la capacidad de invadir larvas con y sin movimiento, estos pueden levantar más del 30% de su cuerpo del sustrato (Campbell, 1997).

Las tácticas que utiliza *S. scapterisci* para descubrir a sus hospederos parecen ser similares a las de *S. carpocapsae*, donde en gran parte los juveniles infecciosos emboscan al hospedero (Grewal *et al.*, 1994). Por lo que *S. carpocapsae* tiene poca posibilidad de controlar larvas de escarabajo debido a su estrategia de emboscar cerca de la superficie del suelo, mientras que larvas de escarabajos son sedentarias y permanecen a una profundidad mayor en el suelo, esto hace que el nematodo presente una respuesta débil de reconocimiento a los escarabajos como hospederos, además de tener dificultad para superar la respuesta inmune del escarabajo, y presentar una baja reproducción en este hospedero. Por el contrario, *H. bacteriophora* y *S. glaseri* están ampliamente adaptados para parasitar

escarabajos, debido a que usan una estrategia de velocidad y responden con fuerza a los escarabajos, superan rápidamente la respuesta inmune y se reproducen bien dentro del hospedero (Gaugler *et al.*, 1997).

La habilidad de dispersión se estima como el porcentaje de nematodos que se desplazan a través de un sustrato de arena o sobre agar, así, la habilidad de dispersión de *H. bacteriophora* y *S. carpocapsae* es significativamente mayor cuando los nematodos son aplicados dentro de cadáveres que en suspensión acuosa (Shapiro y Glazer, 1996).

El nematodo *S. scapterisci* puede ser dispersado por hospederos hasta 23 Km en 20 meses; se dispersó hasta 60 m y en algunos pastos 150 m en menos de un año (Parkman y Smart, 1996). La presencia del hospedero influye en la dispersión de los NE's así, *H. bacteriophora* se dispersa más, en suelos infestados con larvas de *P. japonica* que en los no infestados (Schroeder *et al.*, 1993).

Por otra parte, las lombrices de tierra *Lumbricus terrestres* no incrementan la dispersión vertical de los nematodos; *S. carpocapsae*, *S. feltiae* y *S. glaseri* dentro del suelo, inclusive se puede presentar una mayor dispersión vertical de *S. glaseri* en la ausencia de las lombrices de tierra que en presencia de ellas (Shapiro y Glazer, 1995).

La densidad mayor de nematodos *Heterorhabditis* se encuentra en parcelas con alto grado de sombra. La mayor cantidad de nematodos es recuperada de las capas de suelo más profundas (15-20 y 25-30 cm), mientras que en las capas

superiores del suelo (5-10 cm) los nematodos se encuentran principalmente durante el invierno en parcelas con 75 a 100 % de sombra (Glazer *et al.*, 1996b).

El movimiento vertical de los nematodos es afectado por el tipo de suelo y por el aislamiento. Así, *S. carpocapsae* y *Steinernema* se localizan en suelo a profundidades menores de 15 cm, mientras que especies de *Heterorhabditis* se encuentran en el suelo a profundidades hasta de 35 cm. Mientras que *H. bacteriophora* se dispersa más en suelos areno-arcillo -limosos, y *Steinernema* se desplaza más en suelos arcillo- limo-arenosos (Ferguson *et al.*, 1995).

La migración de los nematodos hacia abajo es inversamente proporcional con relación al diámetro de la columna de suelo. Los nematodos muestran un geotropismo negativo, la mayor cantidad de nematodos son recuperados más del fondo que de la superficie. La supervivencia en suelo contenido en tubos es mayor con humedad entre 2-4% que a menor humedad (0.5 a 1.0 %) y se incrementa a mayores niveles de humedad (4.0 -12.0%) (Duncan *et al.*, 1996b).

Los NE's presentan aspectos biológicos y de comportamiento importantes que le permiten superar las adversidades del hábitat así como las del hospedero, así pueden esperar o ir en busca de su hospedero dependiendo de la especie de NE, además de acortar su ciclo de vida de acuerdo a las condiciones de alimento existentes. Esto hace suponer que dichos organismos se puedan encontrar en la mayoría de regiones geográficas, como el semidesierto zacatecano.

4.2.5. Bacterias simbiotes de NE's

Xenorhabdus (Thomas y Poinar, 1979) y *Photorhabdus* (Boemare *et al.*, 1993) son bacterias entomopatógenas que llevan los nematodos de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis* respectivamente, en forma simbiótica (Dowds, 1997).

La bacteria *Xenorhabdus* produce sustancias que suprimen el desarrollo de otras especies de bacterias como; *Bacillus subtilis*, *B. thuringiensis*, *Enterobacter aerogenes*, *Rhizobium phaseoli* y *Serratia marcescens*. Asimismo, algunas especies de bacterias del suelo son afectadas por *Xenorhabdus* (Genhui y Webster, 1991).

Los NE's se desarrollan y reproducen con otras bacterias diferentes a *Xenorhabdus* spp, así se tiene; *Ochrobactrum anthropi*, *Paracoccus denitrificans* y *Pseudomonas aureofaciens* donde los juveniles infecciosos son igual de patogénicos como los que se reproducen en *X. nematophilus* (Aguillera y Smart, 1993).

La virulencia de *Photorhabdus* sp., cepa K122 se evaluó al inyectar células enteras dentro del hemocele de las larvas de *G. mellonella*. La virulencia se correlacionó con el promedio de desarrollo de los cultivos bacterianos y la muerte total de la larva, después de entrar el cultivo a la fase estacionaria. En esta fase se presenta la máxima producción de las exoenzimas proteasa y lipasa que son tóxicas para el insecto (Clarke y Dowds, 1995).

Al estudiar mutantes de *P. luminescens* que poseen una virulencia mayor para *G. mellonella* para determinar la relación de la virulencia de la bacteria con el sistema antibacteriano de *G. mellonella*, se observó como el suero del insecto retrasó el desarrollo de la bacteria mutante. En parte, esto se atribuye al incremento en la formación de esferoplastos, que está asociada con el incremento de la sensibilidad a insectos aislados y a la reducción de la carga catiónica de la bacteria, que es independiente de la hidrofobicidad de la bacteria. El incremento de la hidrofobicidad del mutante muestra un aumento de la fijación a los hemocitos del insecto, pero no la remoción acelerada de la bacteria en la hemolinfa (Dunphy, 1995).

La emergencia de la bacteria dentro de la hemolinfa, se presenta en forma paralela con el daño del hemocito, pero no se asocia con el nivel de lipopolisacáridos en la bacteria, como tampoco, el promedio de emergencia con la virulencia. El promedio de lipopolisacáridos liberados dentro de la hemolinfa influye en el promedio de daño de los hemocitos (Dunphy, 1995).

De las bacterias simbiotes *X. luminescens*, *X. nematophilus* y *X. poinarii* inyectadas a larvas de *G. mellonella* y *P. japonica*, la bacteria *X. luminescens* es la más patógena para ambas especies de insectos, seguida estrechamente por *X. nematophilus*, mientras que *X. poinarii* mostró baja patogenicidad a dichos insectos (Yeh y Alm, 1992).

Los nematodos sin la bacteria simbiote matan larvas de *Anomala cuprea*, pero no son tan efectivos como cuando tienen su bacteria. Por otra parte, en ausencia del

nematodo, se demuestra que las fases de la bacteria son igualmente patógenas a *G. mellonella* al ser introducidas mediante inyección intrahemocítica (Tachibana *et al.*, 1996).

Las larvas muertas en campo por el nematodo *H. bacteriophora* y la bacteria simbiote *P. luminescens* presentan un color rojo ladrillo (Figura 2, c) y los JI's emergen de los cadáveres después de tres días (Yi *et al.*, 1995).

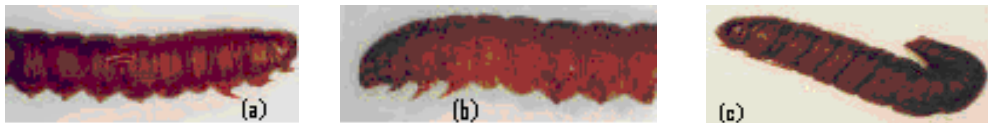


Figura 2. Larvas muertas por nematodos entomopatógenos a) *Steinernema glaseri*, b) *Steinernema riobrave* y c) *Heterorhabditis bacteriophora*.

Las bacterias *Xenorhabdus* spp., y *Photorhabdus* sp., al igual que sus portadores los NE's han evolucionado de tal forma, que se han ido adaptando a las condiciones donde se encuentre el hospedero, sin embargo aún con ese grado de adaptación, también se ha conservado la especificidad de su bacteria simbiote, que juega un papel importante en la infectividad de los insectos.

4.2.6. Hospederos de los NE's

El rango de hospederos naturales de los NE's de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis* se define como el rango de insectos que las poblaciones de nematodos nativos usan para su supervivencia (Peters, 1996).

Los avances importantes del control biológico han originado un desarrollo rápido de *Steinernema* y *Heterorhabditis* spp., como agentes de biocontrol. Así, la introducción de especies de NE's no nativos se incrementa una vez que se conoce el rango de hospederos que controlan (Peters, 1996).

Los nematodos *S. feltiae* y *H. heliothidis* poseen un rango amplio de hospederos (Barbercheck y Kaya, 1990). De manera similar *S. carpocapsae* presenta hospederos de cuatro órdenes de insectos y 10 familias, entre los que destacan, Coleoptera (Curculionidae) y Lepidoptera. En la palomilla de la manzana *Cydia (Carpocapsae) pomonella*; *S. carpocapsae* es el único nematodo que se ha encontrado en este insecto (Peters, 1996).

Los NE's dependen de densidades altas de hospederos para su reproducción, y las especies que se encuentran geográficamente en distintas regiones son más específicas que las especies de amplio espectro. Así, la introducción de especies no nativas, puede tener un impacto menor sobre la fauna nativa de insectos (Peters, 1996).

La existencia de los NE's como agentes de control natural de una gran diversidad de especies de insectos, muestran como estos pueden ser una alternativa más para reducir los problemas de plagas, que el hombre ha originado en su afán de lograr la "modernización agrícola".

4.2.7. La temperatura en el desarrollo de los NE's

La temperatura tiene efectos importantes sobre los aspectos biológicos de los NE's al afectar el desarrollo, la respiración, la sobrevivencia, la dispersión, búsqueda de hospederos e infectividad. La temperatura óptima para la actividad de *Heterorhabditis* es de 20 a 25° C, que es similar a la óptima para la actividad de juveniles infecciosos de otros nematodos parásitos (Griffin, 1993).

Temperaturas arriba de 30° C tienden a inhibir el desarrollo de nematodos dentro del hospedero, en tanto que arriba de 35° C por un largo período de tiempo es detrimental a los juveniles infecciosos. Generalmente, estas temperaturas no son comunes en el hábitat natural de nematodos en campo, a menos que el cadáver del hospedero se encuentre cerca de la superficie del suelo. El hábitat original de cepas y especies de nematodos determina la capacidad a tolerar dichas temperaturas (Gaugler y Kaya, 1990).

La temperatura afecta la infectividad (habilidad de penetrar y elimina al insecto) de *S. scapterisci* y *S. carpocapsae* siendo más efectivo *S. scapterisci* a temperaturas mayores que *S. carpocapsae*. Así, la temperatura óptima para la penetración y establecimiento de *S. carpocapsae* en larvas de *G. mellonella* es de 24° C y de 32° C para *S. scapterisci* (Grewal *et al.*, 1994).

Más del 90% de la población de *S. glaseri* sobrevive durante 32 semanas a 15° C en ausencia de algún insecto hospedero, y a medida que la temperatura aumenta o disminuye, la sobrevivencia decrece, mientras que *S. carpocapsae* se recupera

del suelo después de 32 semanas a 10° C, y *H. bacteriophora* muestra tendencias similares pero con un por ciento menor de sobrevivencia (Gaugler y Kaya, 1990).

Los aislamientos de *Steinernema* spp., que fueron recuperados de tres sitios con gran altitud a una temperatura media baja de 13 - 14° C, se activaron bajo condiciones frías y produjeron JI's a 13° C, mismos que mataron larvas de *G. mellonella* a 6° C (Mracek y Webster. 1993).

4.2.8. Enemigos naturales de los NE's

La efectividad de los NE's esta influenciada por varios factores abióticos y bióticos, que incluyen; textura, temperatura, humedad del suelo, hongos nematófagos y depredadores invertebrados (Kaya, 1990; Georgi *et al.* 1991; Kaya y Gaugler, 1993). La susceptibilidad de los NE's a organismos antagonistas como hongos, bacterias, y depredadores invertebrados, puede ser un factor de mortalidad significativo en el suelo (Poinar, 1990; Timper y Kaya, 1992; Koppenhofer *et al.*, 1996a; Kaya y Koppenhofer, 1996; Koppenhofer *et al.*, 1997).

Los NE's al igual que todos los organismos tienen enemigos naturales, entre los cuales sobresalen los hongos nematófagos, que llegan a ser parte de una cadena alimenticia.

Los NE's son susceptibles a los hongos, debido a que el tercer estado juvenil infeccioso ocurre fuera del hospedero, donde persisten hasta encontrar un nuevo huésped (Koppenhofer *et al.*, 1997).

Así, el hongo *Arthrobotrys oligospora* seguido de *Monacrosporium eudermatum* y *Geniculifera paucispora* suprimen al nematodo *Heterorhabditis hepialus*. La supresión de *H. hepialus* es menor cuando se presentan dos o tres hongos a la vez que cuando se presentan solos (Koppenhofer *et al.*, 1997).

Las conidias del hongo parásito de nematodos *Hirsutella rhossiliensis* depositadas sobre la cutícula del tercer estado juvenil de *S. carpocapsae* y *H. bacteriophora* interfieren en la infección del nematodo sobre larvas de *G. mellonella*. Sin embargo, en *S. glaseri* y *H. bacteriophora* no se reduce la habilidad de infectar a las larvas del insecto (Timper y Kaya, 1992).

Los hongos *A. oligospora*, *G. paucispora*, *M. eudermatum*, *M. cionopagum* y *Nematoctonus concurrens* después de 108 horas a temperaturas de 15 a 20° C atrapan más del 98 % de los juveniles infecciosos de *H. hepialus* y *S. glaseri*. El hongo *G. paucispora* atrapa lentamente ambas especies de nematodos, mientras que *N. concurrens* los atrapa más rápidamente, coloniza a los JI's de *H. hepialus* que mueren entre 7 y 14 días después de ser atrapados (Koppenhofer *et al.*, 1996a).

El enemigo más estudiado de los NE's, es el hongo *H. rhossiliensis* que causa una mortalidad mayor en *S. glaseri* que en *H. bacteriophora*. La susceptibilidad hacia el hongo puede estar asociada con la retención de la cutícula del segundo estado por *H. bacteriophora* (Kaya y Koppenhofer, 1996).

4.2.9 Competencia inter e intraespecífica en los NE's

La competencia inter-específica puede causar una extinción local de una especie de nematodo, por ejemplo después de una infección constante de un hospedero por una especie de la familia Steinernematidae excluye usualmente una especie de la familia Heterorhabditidae. Los mecanismos de superioridad de los steinernematidos se deben al bactericida producido por la bacteria *Xenorhabdus*, simbionte de los steinernematidos, que inhibe a la bacteria *Photorhabdus* simbionte de los heterorhabditidos (Kaya y Koppenhofer, 1996).

Mientras que las competencias entre dos especies (intra-específica) de Steinernematidos muestran que ambas pueden coexistir en un hospedero, pero una especie eventualmente podría prevalecer en el ambiente. Sin embargo, si presentan estrategias diferentes de búsqueda, ambas especies pueden coexistir en el mismo hábitat (Kaya y Koppenhofer, 1996).

La ubicación del hospedero tiene un efecto claro sobre la penetración, producción de la progenie y dinámica de población de las especies de nematodos; así, *S. carpocapsae* deja fuera la competencia a *S. glaseri* cuando el hospedero se deposita sobre la superficie del suelo, pero *S. glaseri* deja fuera de competencia a *S. carpocapsae* cuando el hospedero se deposita dentro del suelo (Koppenhofer *et al.*, 1996b).

Juveniles infecciosos de *S. carpocapsae* y *S. glaseri* parasitan larvas de *Galleria mellonella* y se establecen en el insecto hospedero, sin embargo, aunque ambas

especies producen progenie, *S. carpocapsae* reduce significativamente su progenie. La superioridad de *S. glaseri* se debe a un desarrollo rápido que limita a sus competidores de recursos alimenticios, además, la menor asociación específica de *S. glaseri* con la bacteria simbiote *X. poinarii* permite su desarrollo en cadáveres colonizados por *X. nematophilus*, la bacteria simbiote de *S. carpocapsae* (Koppenhofer *et al.*, 1995).

Cuando *S. carpocapsae* y *H. bacteriophora* compiten simultáneamente por la misma especie hospedera en cajas petri, *S. carpocapsae* infecta significativamente más larvas de *G. Mellonella* que *H. bacteriophora*. Pero si *S. carpocapsae* se añade 15 horas antes que *H. bacteriophora*, entonces *S. carpocapsae* es la especie dominante. Cuando se añade primero *H. bacteriophora* y después de 15 horas se inocula *S. carpocapsae*, *H. bacteriophora* infectan el 71% de los insectos, mientras que *S. carpocapsae* el 67% de los insectos hospederos (Alatorre y Kaya, 1991).

Especies de *Steinernema* y *H. bacteriophora* no pueden coexistir cuando ambos se inoculan directamente dentro del hemocele de un mismo hospedero. Cuando se inocula *Steinernema* en el mismo hospedero después de *H. bacteriophora*, los steinernematidos dominan las primeras seis horas, a partir de entonces *H. bacteriophora* es la especie dominante (Alatorre y Kaya, 1991).

La competencia que se da entre NE's por un hospedero presenta respuestas diferentes, las cuales van desde la exclusión de una de las especies, o la compatibilidad, dependiendo de las especies que intervengan.

4.2.10. Compatibilidad de los NE's con otros microorganismos.

Las aplicaciones de *H. bacteriophora* combinando con *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin originan una mortalidad mayor de larvas de *Spodoptera exigua*, con relación a aplicarlos solos. Por lo que la liberación inundativa de NE's con *B. bassiana* puede proporcionar un mayor control de insectos plaga (Barbercheck y Kaya, 1991).

La combinación de insecticidas selectivos y NE's en invernaderos es efectiva contra plagas de diferentes especies, las que se alimentan de hojas y las que se alimentan de raíces de las plantas. Entre las primeras se encuentran las orugas y los áfidos que son controlados con *Bacillus thuringiensis* (Bt) y plaguicidas con base de jabón, respectivamente. Mientras que las plagas habitantes del suelo son controladas con nematodos (Kaya *et al.*, 1995).

Los NE's son compatibles con Bt o con plaguicidas jabonosos debido a que los nematodos no pierden su efectividad cuando la combinación se aplica inmediatamente. Tampoco Bt o los plaguicidas jabonosos se ven afectados por la presencia de nematodos y estos no reducen su efectividad contra las especies plaga que se desea controlar (Kaya *et al.*, 1995).

De igual manera, la interacción entre Bt y *H. bacteriophora* o *S. glaseri* causa un incremento en la mortalidad de larvas de *Cyclocephala hirta* y *C. pasaedenae*, lo cual debe considerarse en el control mas efectivo de larvas de coleopteros (Koppenhofer y Kaya, 1997).

4.3. Ciclo de vida y conducta de la *Phyllophaga*

La mayor parte de los estudios realizados en México con las especies de *Phyllophaga (sensulato)* están enfocados hacia el conocimiento de la morfología, taxonomía y distribución de los adultos (Figura 3), y con mucha menor frecuencia de los estados inmaduros. Sólo se tienen datos completos o parciales del ciclo de vida de diez de las 369 especies de *Phyllophaga* Harris, 1827 que han sido registradas en la República Mexicana (Morón *et al* 1999). Se han descrito las larvas de 16 especies de este género (Morón 1986, Ramírez–Salinas y Castro-Ramírez 1998, Morón *et al.* 1999, Aragón y Morón 2000, Ramírez–Salinas y Castro. 2000). Rodríguez del Bosque (1988) publicó datos sobre diversos aspectos de la biología, ecología y hábitos de *Phyllophaga crinita* (Burmeister) en el norte de Tamaulipas, donde esta especie presenta un ciclo de vida anual. Morón y colaboradores (1996) refieren que el ciclo de vida de *P. (Triodonyx) lalanza* Saylor es anual y que los huevos son puestos entre julio y principios de agosto, las larvas se desarrollan entre agosto y enero, las pupas se forman entre febrero y abril, mientras que los adultos se encuentran entre abril y junio. Villalobos (1998) observó que *P. (Phytalus) trichodes* (Bates) requiere de dos años para completar su ciclo vital, mientras que *P. (Phyllophaga) misteca* (Bates) lo desarrolla en un año. Ramírez–Salinas y Castro-Ramírez (2000) publicaron observaciones comparativas sobre los ciclos vitales de *P. (Phyllophaga) menetriesi* (Blanchard), *P. (Phyllophaga) tenuipilis* (Bates), *P. (Phyllophaga) ravidia* (Blanchard), *P. (Phyllophaga) testaceipennis* (Blanchard), *P. (Chlaenobia) tumulosa* (Bates) y *P. (Phytalus) obsoleta* (Blanchard), pero no detallaron la duración de las etapas larvarias. Se han realizado escasas observaciones sobre

la actividad de los adultos y los hábitos de alimentación de las larvas, sobre todo cuando se registraron daños importantes en los cultivos agrícolas. Sin embargo, para desarrollar un método de control adecuado para las plagas agrícolas es importante conocer el ciclo de vida de la especie causante del problema. Uno de los principales problemas de la agricultura para el estado de Puebla son los daños ocasionados por la gallina ciega. Por ejemplo, Aragón y Morón (1998), registraron poblaciones de hasta 122 larvas por m² de *P. vetula* dañando el cultivo de maíz, y confirmaron que *P. ilhuicaminai* es una de las especies que más daño ocasiona en el cultivo de flores de “estatis” (*Limonium sinuatum* [L.]); y Nochebuena (2004), además menciona refiere que la especie más abundante en cultivos de maíz para localidades cercanas a la ciudad de Puebla es *P. ravida*.

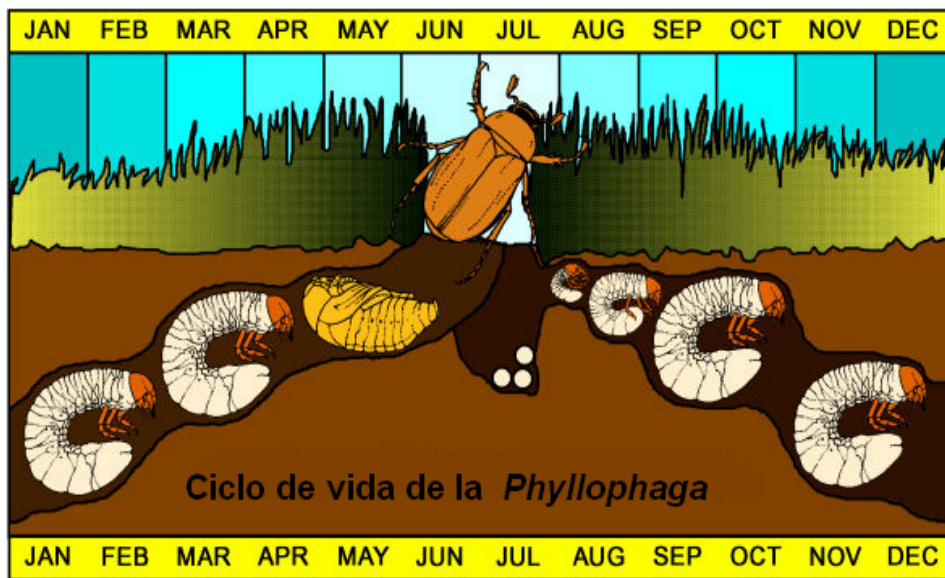


Figura 3. Ciclo de vida anual de la “gallina ciega” (*Phyllophaga* sp.) (Tomado de Entomology, 2000)

4.3.1. Taxonomía de *Phyllophaga*

De acuerdo a Morón (1986):

Reino: Animal

Clase: Insecta

Orden: Coleoptera

Familia: Melolonthidae

Subfamilia: Melolonthinae

Tribu: Melolonthini

Subtribu: Rhizotrogina

Genero: *Phyllophaga*

Especie: spp.

CAPÍTULO V

MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Área de estudio

El presente estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Control biológico perteneciente al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR) IPN Unidad Oaxaca, que se encuentra ubicado en el municipio de Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca (México). Las coordenadas geográficas del CIIDIR son: 17° 02' de latitud norte y 96° 44' de longitud oeste con respecto al meridiano de Greenwich, y se encuentra a una altitud de 1,550 msnm (INEGI, 2001).

La colecta de la gallina ciega se realizó en los terrenos de la población de Rancho Quemado, Cuilapam de Guerrero, Oaxaca. Utilizando una pala cuadrada y una charola de 40 x 50 x 10 cm con tierra húmeda, en la cual las larvas se trasladaron al laboratorio. Posteriormente se le sembraron semillas de Maíz; las larvas permanecieron almacenadas de dos a tres semanas en recipientes con tierra húmeda a los cuales se les sembraron semillas de maíz para que se alimentaran de las raíces de las plántulas (Figura 4).



Figura 4. Colecta de la gallina ciega *P. vetula*.

5.2. Crianza del nematodo

Los nematodos se reprodujeron en laboratorio utilizando *Galleria mellonella*, fueron inoculadas, al paso de 48 h la larva muerta se colocó en cámara húmeda, después de cinco días los nematodos que emergieron fueron cosechados para la siguiente generación.

La infección de ambos, esteirnermatidos y heterorhabditidos es iniciada por la penetración del tercer estadio juvenil (J_3) al hospedero, estado infectivo que está adaptado tanto morfológica como fisiológicamente para permanecer en el medio ambiente durante largos períodos, sin alimentarse. Dentro de las adaptaciones morfológicas se menciona el aparato digestivo el cual no es funcional, la boca y el ano están cerrados. La bacteria simbiótica (*Xenorhabdus* spp.; *Phorhabdus* sp.), juega un papel nutricional importante dentro del hospedero, además de matar

rápidamente al insecto, permite a los nematodos explotar un amplio rango de hospederos. Esto ha despertado el interés en el desarrollo de estos nematodos como agentes de control biológico (Gorsuch, 1982).

5.3. Mantenimiento de la colonia de *Galleria mellonella*

La reproducción de los nematodos entomopatógenos fue *in vivo*, utilizando como hospedero a la palomilla de la cera, la cual fue colectada en el apiario de la escuela secundaria Técnica N°.14 de Reyes Mantecón, Oax., en estado de larva de tercer estadio.

Posteriormente se colocaron en paneras (recipientes de plástico de 30 cm de largo x 20 cm de ancho x 15 cm de profundidad) a cuya tapa se le hicieron pequeñas perforaciones para permitir el intercambio gaseoso (Figura 5), las cuales contenían la siguiente dieta:

Miel de abeja	97.5 ml
Glicerol	120 ml
Salvado estéril	37.5 g
Cereal de arroz (cereal infantil 1 ^a etapa)	300 g
Levadura	75 g

(Tomado de Ibarra, 1998)

Forma de preparación de la dieta:

1. Se mezcló el cereal de arroz con el salvado estéril.
2. Se agregó la levadura y se mezcló bien.
3. Una vez hecha la mezcla de los ingredientes secos se agregó poco a poco el glicerol, mezclándose bien (de preferencia hacerlo con la mano).
4. Una vez hecho esto se agregó la miel (siempre al final) y se terminó de mezclar hasta homogeneizar perfectamente (Figura 6).
5. En ocasiones se le agregó a la dieta restos de panales de apiario para facilitar la adaptación de la larva y obtener mejores resultados.



Figura 5. Paneras donde se criaron las larvas de *G. mellonella*



Figura 6. Dieta homogenizada para larvas de *G. mellonella*

Las larvas ya dentro de la panera siguieron alimentándose hasta llegar al estado adulto (palomilla); en esta etapa se les colocaron servitoallas pegadas al interior de la tapa para que ovipositaran sobre ellas; posteriormente se recortaron los fragmentos de servitoalla que contenían huevecillos colocándose en dietas frescas para que eclosionaran y siguieran su desarrollo, obteniéndose de esta manera grandes cantidades de larvas para utilizarse como hospedero en la reproducción de los nematodos. De las larvas obtenidas algunas se apartaron para continuar con el ciclo y mantener la colonia de *G. mellonella*.

5.4. Nematodos

Se utilizaron tres especies de nemátodos: *H. bacteriophora*, *S. riobrave* y *S. Glaseri*. Los juveniles infectivos fueron sometidos a diferentes niveles de desecación y temperatura.

5.5. Procedimiento experimental

5.5.1. Tratamiento térmico

Para evitar la pupación, a la galerías antes de aplicar los nematodos se les dio un tratamiento térmico (Figura 7). Para el tratamiento térmico se utilizó agua destilada, vasos precipitados, termómetro, estufa y pinzas. El agua destilada se calentó hasta llegar a 56° C, luego se introdujeron larvas de *Galleria mellonella* durante 15 segundos, y después se les aplicó agua fría por un minuto.

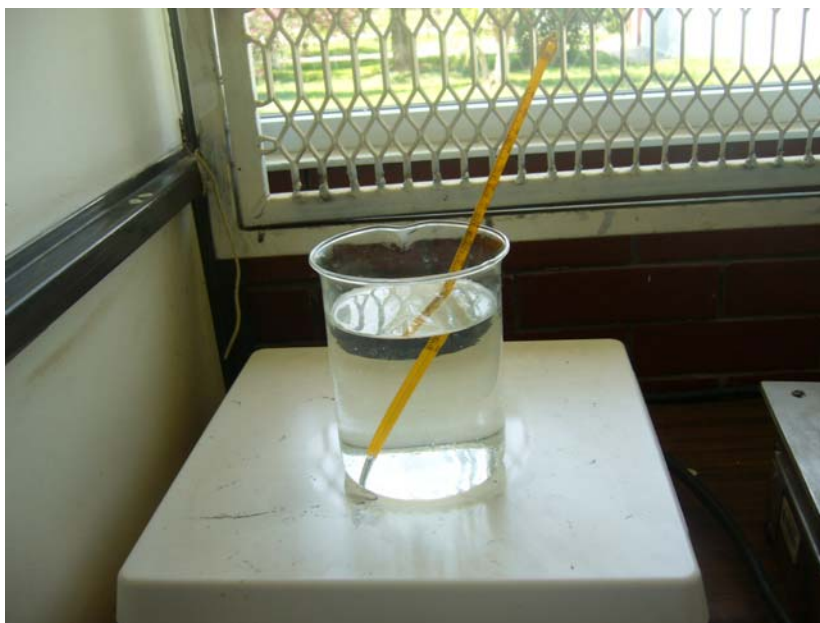


Figura 7. Agua destilada para tratamiento térmico.

5.5.2. Cosecha de los nemátodos

10 larvas de *G. mellonella* fueron infectadas por medio de la aplicación de 200 NE's infectivos juveniles por caja Petri de 90 mm de diámetro, forradas de papel

filtro. Después de ser infectadas, las larvas muertas, fueron transferidas a papel filtro (trampas de emergencia), las cuales se construyen colocando cajas de Petri de 60 mm, dentro de cajas de Petri de 90 mm, que contienen agua destilada (Figura 8). Los nematodos fueron almacenados a 15° C y se utilizaron menos de tres semanas después en los bioensayos.



Figura 8. Trampa White.

5.5.3 Generación de líneas tolerantes a la desecación. Experimento 1

Los niveles de desecación se obtuvieron aplicando distintas concentraciones de poliethylen glicol (PEG 8000) por cada 10 ml de agua destilada se aplicaron 3, 5 y 7 g de PEG 8000 para obtener 0.97, 0.90 y 0.86 para obtener valores de A_w , respectivamente (Figura 9) manteniéndola por 48 h, después se evaluó el porcentaje de sobrevivencia o la capacidad de infección de los nematodos. La progenie producida fue sometida a los mismos tratamientos de desecación por

seis ocasiones más, con lo cual se obtuvo una línea de nemátodos tolerantes a la desecación por cada especie en estudio.



Figura 9. Larvas de *G. mellonella* inoculada con NE's a un A_w de 0.86.

5.5.4. Generación de líneas con Tolerancia al calor. Experimento 2

Los niveles de tolerancia a calor se aplicaron exponiendo a los nematodos a temperaturas de 25, 30 y 35° C por un período de 48 h. utilizando dos Estufas Marca BOEKEL Scientific Modelo 136400 y Marca RIOSSA Modelo EC – 33 (Figura 10); después se evaluó el porcentaje de sobrevivencia y capacidad de infección de los nematodos por un procedimiento semejante al descrito anteriormente. Al cabo de seis ciclos, se obtuvo una línea de nemátodos tolerante a temperaturas altas para cada una de las especies de nematodos en estudio.



Figura 10. Aplicación de tratamiento de calor para el proceso de selección

5.5.5. Experimentos para la evaluación de la tolerancia adquirida

Estos experimentos se realizaron en laboratorio, aplicando condiciones de baja humedad o alta temperatura a las líneas generadas. En estos dos experimentos se evaluaron tres tratamientos, uno por cada especie de nematodo de las líneas generadas, más un testigo (Cuadros 1 y 2). Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con cuatro repeticiones. Durante tres días, se contaron las larvas muertas por tratamiento. Después de transformar los datos de porcentaje de sobrevivencia, por medio de arco seno, se realizó el análisis de varianza para la comparación de medias, aplicando la prueba de Tukey al 0.05 de probabilidad.

Cuadro 1. Líneas de nematodos tolerantes evaluados a una temperatura de 35° C, utilizando larvas de *G. mellonella* y de *P. vetula*.

Tratamiento	Nematodo
1	<i>H. bacteriophora</i>
2	<i>S. riobrave</i>
3	<i>S. glaseri</i>
4	Ninguno

Cuadro 2. Líneas de nematodos tolerantes evaluados a una A_w de 0.86, utilizando larvas de *G. mellonella* y de *P. vetula*.

Tratamiento	Nematodo
1	<i>H. bacteriophora</i>
2	<i>S. riobrave</i>
3	<i>S. glaseri</i>
4	Ninguno

5.5.5.1. Evaluación de la tolerancia a baja A_w . Experimento 3

Por medio de la adición de agua destilada, se consiguió un porcentaje de humedad de 17.5 % en la caja petri, equivalentes a un A_w de 0.86 (Figura 11). Posteriormente se aplicaron 10 larvas de *Galeria mellonella* de tercer estadio o de *Phyllophaga vetula* de segundo estadio por caja y 200 nematodos por caja (Figura 12).

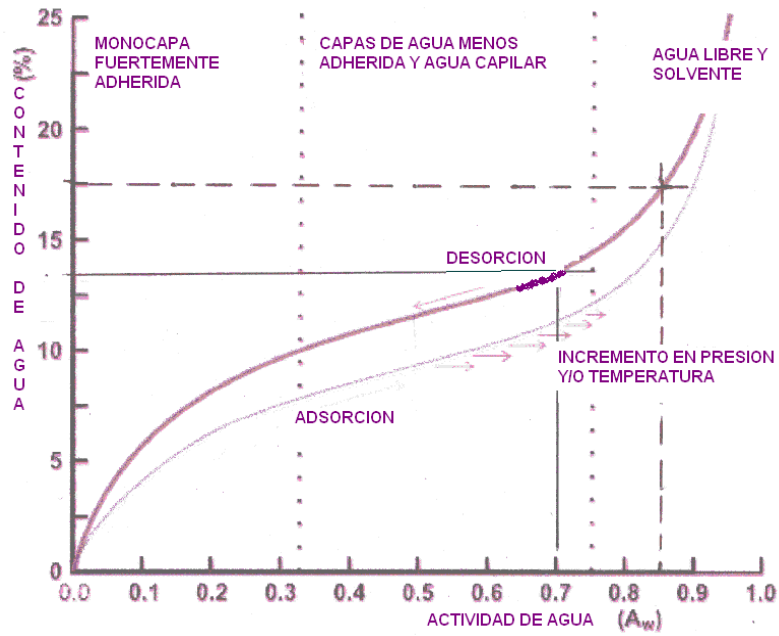


Figura 11. Grafica que relaciona la actividad de agua con el porcentaje de humedad en caja petri.



Figura 12. Larvas de *P. vetula* expuestas a líneas de nematodos tolerantes a un A_w de 0.86.

5.5.5.2. Evaluación de la tolerancia a temperaturas altas. Experimento 4

Procediendo de manera similar a lo realizado en el experimento 3, se evaluó la tolerancia de las líneas generadas sometiéndolas a una temperatura de 35° C durante 72 hrs.

CAPÍTULO VI

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. EXPERIMENTO 1. Generación de las líneas resistentes a alta temperatura

6.1.1. *Heterorhabditis bacteriophora*

En los bioensayos realizados con el nematodo *H. bacteriophora*, se observó que desde la F3 comenzó a adquirir tolerancia, y al llegar a la F6 alcanzó un 70% de sobrevivencia a 35° C, pero el tratamiento a una temperatura de 30° C alcanzó un 100% de tolerancia (Figura 13).

La temperatura tiene efectos profundos sobre los aspectos biológicos de los NE's al afectar el desarrollo, la respiración, la sobrevivencia, la dispersión, búsqueda de hospederos e infectividad. El rango de temperatura óptima para la actividad de *Heterorhabditis* es de 20 a 25° C, que es similar a la óptima para la actividad de juveniles infecciosos de otros nematodos parásitos (Griffin, 1993). Otra fuente reporta que temperaturas superiores de 35 a 37° C interrumpen el ciclo de vida, siendo la óptima de 24° C (Nguyen y Smart, 1992b). Sin embargo, de acuerdo al presente estudio, debido a la resistencia adquirida, el nematodo fue todavía muy efectivo a 30° C.

De acuerdo a Selvan *et al.* (1996), los nematodos *H. bacteriophora* expuestos a

una temperatura subletal de 35° C durante 3 hrs, con un período de adaptación de 1 – 2 h. a 25° C, son capaces de matar a los insectos hospederos a temperaturas de 35 y 40° C, lo cual es otro soporte que avala los resultados logrados con respecto a adquisición de tolerancia a altas temperatura de *H. bacteriophora*.

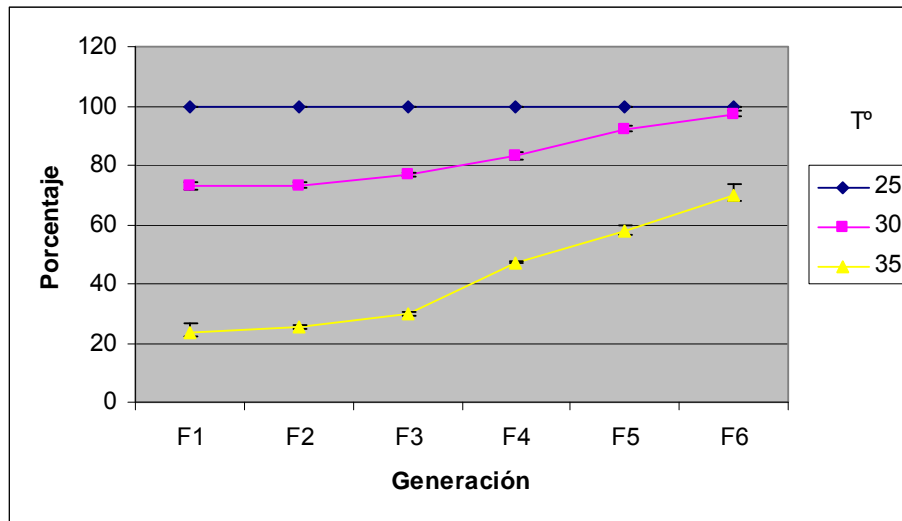


Figura 13. Porcentaje de sobrevivencia del nematodo *H. bacteriophora* a diferentes temperaturas

6.1.2. *Steinernema riobrave*

La realización del experimento con el nematodo *S. riobrave*, fue algo tolerante ya que al llegar a la F6 se observa que tiene una tolerancia de 35° C, pero en el transcurso del experimento de la F1 a la F6 hubo una ganancia de tolerancia de 43% de sobrevivencia a comparación de una temperatura de 30° C que tuvo una ganancia de 70% (Figura 14).

Los nematodos de la familia *Steinernematidae* tienen un límite de aproximadamente 35° C para poder realizar su ciclo de vida y pueden tener resistencia a temperaturas inferiores a 10° C (Kaya y Gaugler, 1993).

Este nematodo tiene una gran capacidad de sobrevivencia, más del 80 % de la población de *S. glaseri* sobrevive expuestas a una temperatura de 10° C durante un largo período pero al incrementar la temperatura el nivel de sobrevivencia disminuye significativamente (Gaugler y Kaya, 1990).

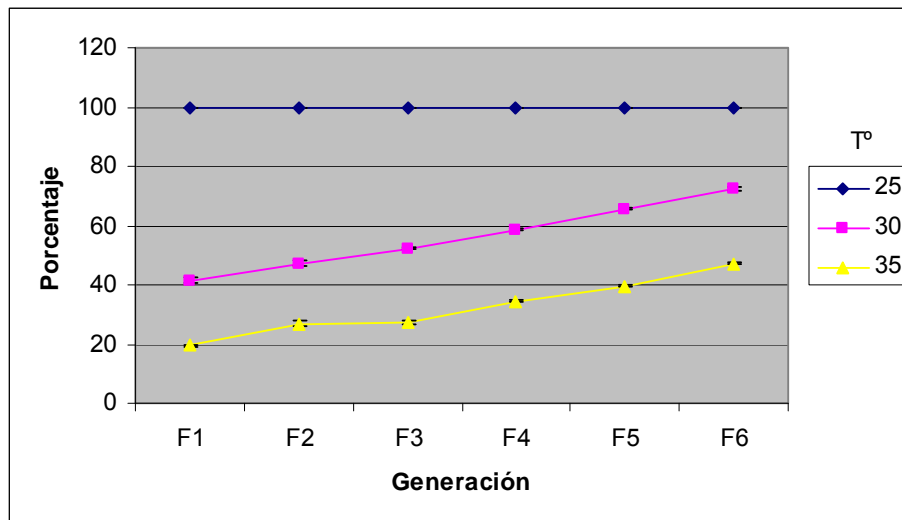


Figura 14. Porcentaje de sobrevivencia del nematodo *S. riobrave* a diferentes temperaturas

6.1.3. *Steinernema glaseri*

En los bioensayos realizados con el nematodo *S. glaseri* se observó una alta capacidad de tolerancia a temperaturas de 35° C, ya que obtuvo porcentajes de sobrevivencia muy altos (84 % de sobrevivencia) al compararlos con los dos

nematodos anteriormente evaluados, pero también se observó que a una temperatura de 30° C alcanzó un 100% de sobrevivencia (Figura 15).

Dada su mayor masa corporal, este nematodo tiene una gran capacidad de sobrevivencia. Más del 90% de la población de *S. glaseri* sobrevivió durante 32 semanas a 15° C en ausencia de algún insecto hospedero, pero a medida que la temperatura aumentó, la sobrevivencia disminuyó (Gaugler y Kaya, 1990).

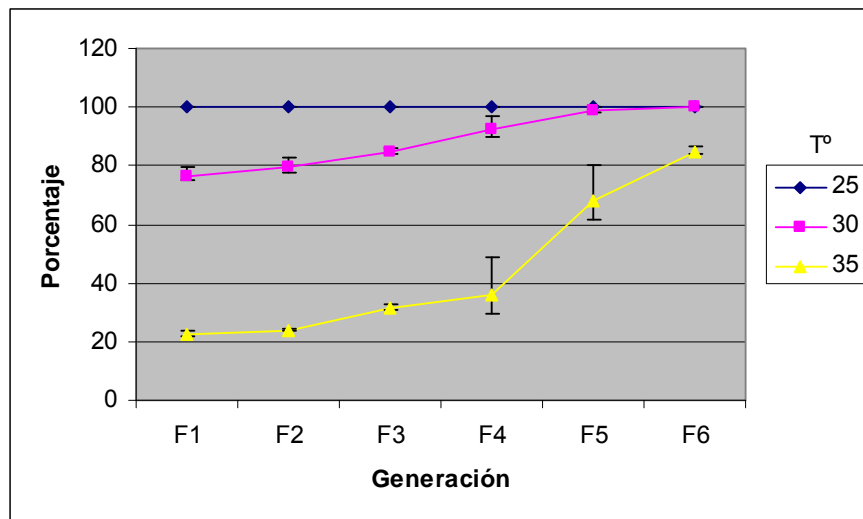


Figura 15. Porcentaje de sobrevivencia del nematodo *S. glaseri* a diferentes temperaturas

6.2. EXPERIMENTO 2. Generación de líneas tolerantes a la desecación

6.2.1. *Heterorhabditis bacteriophora*

En la Figura 16 se observó que la generación F1, a una A_w de 0.86, se logró alcanzar un porcentaje de 20 máximo, a medida de que se avanzan las

generaciones ocurre una decadencia en menos de 20 % para la F4 no ocurriendo en las demás.

En la dosis 0.90 se mantiene constante la sobrevivencia mientras crece la generación hasta la F2, en F3 y en la F4 disminuye hasta alcanzar la máxima de 38 % en F6, para la dosis de 0.97 mantiene un 60% para todas las generaciones (Figura 16).

Los nematodos *H. bacteriophora* para su sobrevivencia debe de ser de alta humedad relativa equivalente al 100% de actividad de agua (A_w), la sobrevivencia se afecta con una humedad relativa muy baja, no existe una sobrevivencia al 0.85 (Forschler y Gardner 1991).

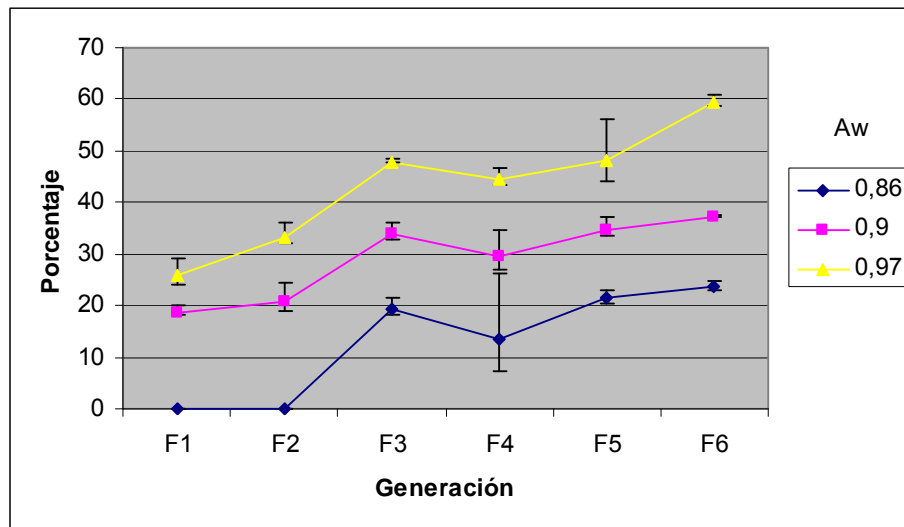


Figura 16. Porcentaje de sobrevivencia del nematodo *H. bacteriophora* a diferentes A_w

6.2.2. *Steinernema riobrave*.

En la grafica del porcentaje de sobrevivencia del nematodo *Steinernema riobrave* a diferentes A_w se observó que en la F2 tiene un aumento de sobrevivencia mayor a 20 % pero a medida que pasaron las generaciones de la F3 y F4 se sigue manteniendo en un 20 % de sobrevivencia, pero al llegar a la F5 y F6 aumentó la sobrevivencia ≥ 30 % todos sometidos a una actividad de agua muy baja de 0.86, a comparación de una actividad de agua de 1.0 que mantiene su nivel de sobrevivencia del 100 %, pero a menor actividad de agua reduce su nivel de sobrevivencia (Figura 17).

Los nematodos entomopatógenos tienen un nivel de sobrevivencia a una humedad relativamente alta, pero a medida que se le baja la humedad el nivel de sobrevivencia disminuye, el nematodo *S. riobrave* puede sobrevivir a un 30% de humedad (Forschler y Gardner, 1991).

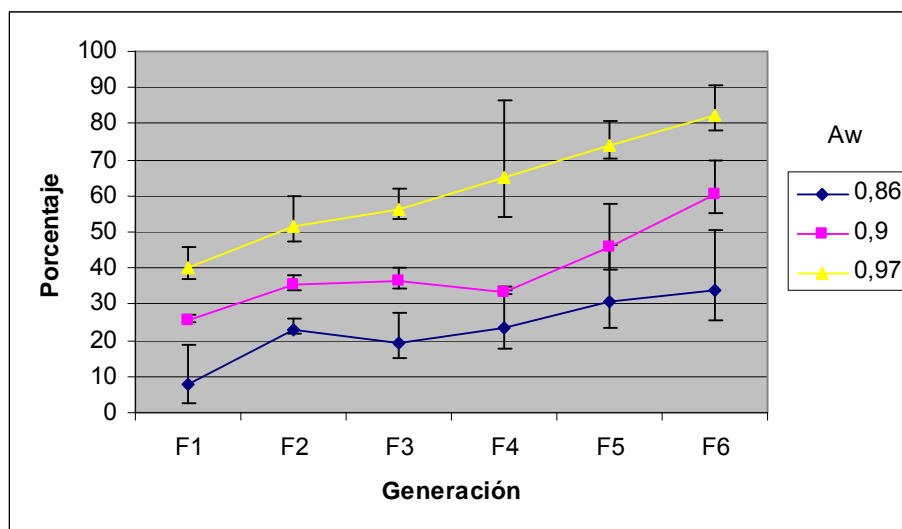


Figura17. Porcentaje de sobrevivencia del nematodo *S. riobrave* a diferentes A_w

6.2.3. *Steinernema glaseri*

Se observó que a un $A_w = 0.86$ no hubo sobrevivencia de nematodos de la F1 y F2, pero al someterlos a diferente actividad de agua pasando a la F3 se observó un incremento de tolerancia del 20 %, al pasar a la F4 disminuyó la tolerancia a un 15 %, en la F5 se observó que hay un incremento al igual que la F6 hasta llegar a nivel de tolerancia a la desecación 43 % de sobrevivencia (Figura 18).

El *S. glaseri* presentó mayor mortalidad a una humedad del 20 % que equivale a una A_w de 0.9 (Sosa y Hall, 1989).

Shetlar *et al.*, (1988) demostraron que hay una reducción en la mortalidad de *S. glaseri* cercana al 50 % cuando la humedad se reduce de un 40% a un 25%. Resultados similares son encontrados por (Jackson, 2003), quienes mencionaron que los nematodos aplicados en condiciones de alta humedad, permanecen más estables que en condiciones de poca humedad.

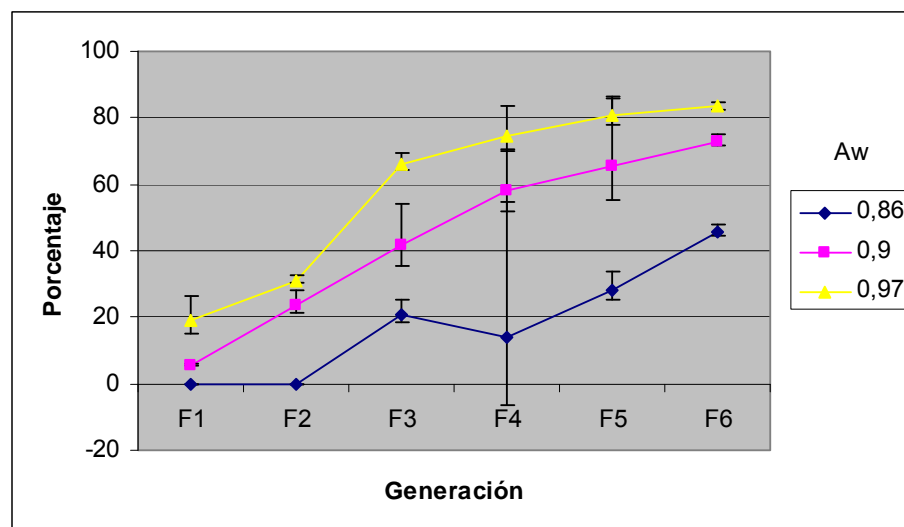


Figura 18. Porcentaje de sobrevivencia del nematodo *S. glaseri* a diferentes A_w

6.3. Experimento 3. Evaluación de la capacidad de control de larvas de *Phyllophaga vetula* de las líneas generadas

6.3.1 Evaluación a temperatura alta (35° C)

El análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas para tratamientos, pero también un alto coeficiente de variación (Cuadro 3). Este pudo haber sido causado, además del error experimental, por la alta gama de mecanismos de defensa que tienen las larvas de escarabeidos. Algunas barreras físicas incluyen el integumento, el cual se endurece con la edad de la larva; placas criba bloqueando los espiráculos, así como el tamaño de los nemátodos con relación al orificio de entrada (Gaugler y Molloy, 1981). Por medio de mecanismos fisiológicos, la larva puede destruir al nemátodo invasor con enzimas digestoras o por encapsulación melanótica (Jackson y Brooks, 1989).

Cuadro 3. Análisis de varianza del experimento con larvas de *P. vetula* a 35° C

Fuente de variación (F.V)	Grado de Libertad (G.L)	Suma de Cuadrados (S.C)	Cuadrados medios (C.M)	Valor F	Prob>F
Tratamientos	3	9615	3205	9.71	0.0007
Error	16	5280	330		
Total	19	14895			
$r^2 = 0.645519$		C.V. 59.56			

La prueba de Tukey indicó que los nemátodos *S. glaseri* y *S. riobrave* tuvieron el mismo porcentaje de mortalidad a 35° C, superando significativamente a *H. bacteriophora*; el testigo mostró mortalidad baja (Cuadro 4).

Al parecer la temperatura de 35° C fue muy alta, porque la temperatura óptima para la actividad de *Heterorhabditis* es de 20 a 25° C, que es similar a la óptima para la actividad de juveniles infecciosos de otros nematodos parásitos (Griffin, 1993).

Los efectos directos de la temperatura sobre la *Phyllophaga vetula*, estos se consideraron bajos, dada la mortalidad no significativa del testigo. Morón *et al.* (2003) cultivaron cinco especies de *Phyllophaga* a una T = 26 ± 2° C, considerada cercana a la óptima, lo cual indicó que 35° C fue una temperatura no muy alta para *P. vetula*.

Cuadro 4. Mortalidad de *P. vetula* por especie de nematodo a 35° C.

Tratamientos	% de mortalidad*	
Nematodo		
<i>Steinernema glaseri</i>	66	a
<i>Steinernema riobrave</i>	66	a
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	24	b
Testigo	6	b

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

6.3.2. Evaluación con baja actividad de agua (A_w de 0.86)

El análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas para tratamientos, pero con un coeficiente de variación relativamente alto para condiciones de laboratorio (Cuadro 5).

Cuadro 5. Análisis de varianza del experimento con larvas de *P. vetula* a un A_w de 0.86.

Fuente de variación (F.V)	Grado de Libertad (G.L)	Suma de Cuadrados (S.C)	Cuadrados medios (C.M)	Valor F	Prob>F
Tratamientos	3	4740	1580	33.26	0.0001
Error	16	760	47.5		
Total	19	5500			

$r^2 = 0.86181818$ C.V. = 27.56810

El nematodo con más porcentaje de mortalidad y con baja actividad de agua fue *H. bacteriophora.*, seguido por *S. riobrave.* (Cuadro 6). En este caso el testigo no fue afectado, por lo cual el nivel de A_w aplicado no fue extremo. Morón *et al.* (1999) cultivaron cinco especies de *Phyllophaga* a $70 \pm 5\%$ de HR, lo cual equivale a un A_w de 0.98. , por lo que *P. vetula* estuvo sujeta a un estrés osmótico moderado a 0.86 de A_w . *S. glaseri* el menos efectivo; ha presentado alta mortalidad en otros estudios a una humedad del 20 %, la que equivale a una A_w de 0.90 (Sosa y Hall, 1989).

Cuadro 6. Mortalidad de *P. vetula* por especie de nematodos a un A_w de 0.86.

Tratamientos	% de mortalidad*	
Nematodo		
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	42	a
<i>Steinernema riobrave</i>	30	ab
<i>Steinernema glaseri</i>	28	b
Testigo	0	c

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

6.4. EXPERIMENTO 4. Evaluación de la capacidad de control de las líneas generadas en larvas de *Galleria mellonella*

6.4.1. Evaluación a alta temperatura (35° C)

El análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas para tratamientos, pero el coeficiente de variación tuvo valores bajos, propios de experimentos de laboratorio (Cuadro 7). Cuando las larvas de *Galleria mellonella* prefieren temperaturas cálidas (> de 27° C); las mayores a 46° C son letales para el desarrollo de todas sus etapas larvarias Tew, J (2000).

Las condiciones óptimas de temperatura para el cultivo de galería son de 25° C (Kaleli *et al.*, 2007), lo cual implica que 35 ° C fue una temperatura excesiva para esta especie.

Cuadro 7. Análisis de varianza del experimento con larvas de *G.mellonella* a un temperatura de 35° C.

Fuente de variación (F.V)	Grado de Libertad (G.L)	Suma de cuadrados (S.C)	Cuadrados medios (C.M)	Valor F	Prob>F
Tratamientos	3	32973.75	10991.25	199.84	0.0001
Error	16	880	55		
Total	19	33853.75			
R ² = 0.974006		C. V. 11.45359			

Tanto *S. riobrave* como *S. glaseri* lograron un 100% de mortalidad a alta temperatura, seguidos por *H. bacteriophora.*, el cual mostró también buena capacidad de control (Cuadro 8).

Shapiro-Llan *et al.* (2005) detectaron al nematodo *S. riobravus* como el más tolerante a calor y a deficiencias de oxígeno. Los menos tolerantes fueron *H. bacteriophora* y *S. carpocapsae*. Este último solo ha resistido seis h a 35° C en otros estudios (Cheng y Hou, 1997). Incluso las temperaturas moderadas (25° C) han logrado eliminar a los nemátodos dentro de los cadáveres de galerías después de 28 días (Gaugler *et al*, 1997).

Cuadro. 8. Mortalidad de *G. mellonella* por especie de nematodos a una 35° C.

Tratamientos	% de mortalidad*
Nematodo	
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	58 b
<i>Steinernema riobrave</i>	100 a
<i>Steinernema glaseri</i>	100 a
Testigo	1 c

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

6.4. 2. Evaluación con baja actividad de agua (A_w de 0.86)

Al utilizar larvas de galerías se obtuvieron coeficientes de variación bajos en el análisis de varianza (Cuadro 9), lo cual podría atribuirse a una mayor susceptibilidad de *mellonella* a los nemátodos bajo condiciones de estrés osmótico. Las condiciones óptimas de humedad para el cultivo de galerías son de 60 % de HR (Kaleli *et al.*, 2007); la equivalencia de 60% de humedad es de un $A_w = 0.975$

Cuadro 9. Análisis de varianza del experimento con larvas de *G. mellonella* a un A_w de 0.86.

Fuente de variación (F.V)	Grado de libertad (G.L)	Suma de Cuadrados (S.C)	Cuadrados medios (C.M)	Valor F	Prob>F
Modelo	3	32180	10726.66	204.32	0.0001
Error	16	840	52.5		
Total	19	33020			
$r^2 = 0.974561$		C.V. = 10.81446			

Tal como se observó en el cuadro 9, también en el cuadro 10, se observaron altos porcentajes de mortalidad, llegando a 98 % en *H. bacteriophora* como en *S. riobrave*, lo cual confirma la aseveración anterior.

El nemátodo *S. glaseri* mostró el menor porcentaje de mortalidad al igual con los resultados obtenidos por de Brown y Gaugler (1997), quienes encontraron que la emergencia de estos nematodos fue mas afectada que la de *H. bacteriophora* bajo condiciones de baja humedad relativa (75 %).

Cuadro 10 Mortalidad de *G. mellonella* por diferentes nematodos a un A_w de 0.86.

Tratamientos Nematodo	% de mortalidad*
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	98 a
<i>Steinernema riobrave</i>	98 a
<i>Steinernema glaseri</i>	72 b
Testigo	0 c

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

CAPÍTULO VIII

CONCLUSIONES

La disminución de la actividad del agua (A_w) redujo proporcionalmente la sobrevivencia de los nematodos *H. bacteriophora*, *S. riobrave* y *S. glaseri*, siendo el *S. glaseri* el que incremento mayormente su tolerancia a la desecación seguido por *S. riobrave*.

En las tres especies de nematodos se incremento su tolerancia a altas temperaturas, específicamente *S. glaseri* y *H. bacteriophora*, incrementaron su sobrevivencia de 80 y 70 % a 35° C, respectivamente, en la F6.

En la evaluación de las líneas generadas con gallina ciega sobresalieron por su tolerancia a bajos A_{ws} *H. bacteriophora* y *S. riobrave*, mientras que por su tolerancia a altas temperaturas sobresalieron *S. glaseri* y *S. riobrave*.

En la evaluación de las líneas de nematodos generadas con *Galleria mellonella* sobresalieron *Steinernema glaseri* y *Steinernema riobrave* por su capacidad de tolerancia a alta temperatura; *Heterorhabditis bacteriophora* y *Steinernema riobrave* fueron los que más incrementaron su capacidad de tolerancia a baja actividad del agua.

S. glaseri resultó ser la más efectivo para infectar larvas de *Phyllophaga vetula* y *Galleria mellonella* a altas temperaturas, mientras que *H. bacteriophora* presentó mayor capacidad para infectar gallina ciega y galerías a mayor desecación.

CAPÍTULO VIII

LITERATURA CITADA

Agüera, M. M. and R. Gabarra. 1994. On the occurrence of *Steinernema glaseri* (Steiner, 1929) (Steinernematidae) and *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1976 (Heterorhabditidae) in Cologne, Spain. *Fundamental and Applied Nematology*, 17(5): 414-443.

Aguillera, M. M. and G. C. Smart. 1993. Development, reproduction and pathogenicity of *Steinernema sacpterisci* in monoxenic culture with different species of bacteria. *Journal of Invertebrate Pathology*, 62: 289 – 294.

Akhurst, R. J. and Dunphy, G. B. (1993). Tripartite interactions between symbiotically associated entomopathogenic bacteria, nematodes and their insect hosts. En: *Parasites and pathogens of insects*. Vol. 2 Pathogens ed. Ed. N. E. Beckge, S. N. Thomson and B. A. Federici. Pp. 1-23, Academic, Press. Inc.

Alatorre Rosas, R. 1999. Perspectiva del uso de nemátodos entomopatógenos en México, pp. 72, 73, 77. *In: Potencial de Nemátodos Entomopatógenos en el Control de Plagas*. H. C. Arredondo; J. Molina; V. M. Hernández (eds.). Universidad de Colima. Colima, Col., México.

Alatorre Rosas, R. y A. Guzmán Franco. 1999. Nemátodos parásitos de insectos, pp. 13, 21, 22. *In: Potencial de Nemátodos Entomopatógenos en el Control de*

Plagas. H. C. Arredondo; J. Molina; V. M. Hernández (eds.). Universidad de Colima. Colima, Col., México.

Alatorre, R. R. and H. K. Kaya, 1990. Interspecific competition between entomopathogenic nematodes in the genus *Heterorhabditis* and *Steinernema* for an insect host in sand. *Journal of Invertebrate Pathology*, 55: 179-188.

Alatorre, R. R. and H. K. Kaya, 1991. Interaction between two entomopathogenic nematode species in the same host. *Journal of invertebrate Pathology*, 57: 1 – 6.

Aragón y Morón, 1998. *Avances en el estudio de la diversidad, importancia y manejo de los coleópteros edafícolas americanos*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y Sociedad Mexicana de Entomología, Puebla, México.

Barbercheck, M. E., and H. K. Kaya, 1990. Interactions between *Beauveria bassiana* and the entomogenous nematodes *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis heliothidis*. *Journal of invertebrate Pathology*, 55: 225 – 234.

Barbercheck, M. E. and H. K. Kaya, 1991. Competitive interactions between entomopathogenic nematodes and *Beauveria bassiana* (Deuteromycetina: Hyphomycetes) in soilborne larvae of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Nactuidae). *Environmental Entomology*, 20 (2): 707 – 712.

Batra, S. W. T. 1982. Biological control in agroecosystems. *Science*, 215: 134-139.

Bedding, R. A. 1984. Large scale production, storage and transport of the insect-parasitic nematodes *Neoplectana* and *Heterorhabditis* spp. *Annals of Applied Biology*. 104:117-20

Blaxter, M. L., P. De Ley., J. R. Garey., L. X. Liu., P. Scheldeman., A Vierstraete., J. R. Vanfleteren., L. Y. Mackey., M. Dorris., L. M. Frisse., J. T. Vida and W. K. Thomas, 1998. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature*, 392: 71 - 75

Boemaere, N. E., R. J. Akhurst and R. G. Mourant, 1993. DNA relatedness between *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae), symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes, and a proposal to transfer *Xenorhabdus luminescens* to a new genus, *Photorhabdus* gen. nov. *International Journal Systematic of Bacteriology*, 43: 249 – 255.

Burnell A. M. y B. C. A. Dowds, 1996. The genetic improvement of entomopathogenic nematodes and their symbiont bacteria: phenotypic targets, genetic limitations and an assessment of possible hazards. *Biocontrol Science and Technology*. 6(3): 435-447.

Cabanillas, H. E. 1999. The entomopathogenic nematode *Steinernema riobravis* and its potential as biocontrol agent, p. 51. *In: Potencial de Nemátodos Entomopatógenos en el Control de Plagas*. H. C. Arredondo; J. Molina; V. M. Hernández (eds.). Universidad de Colima. Colima, Col., México.

Campbell, J. F. 1997. Inter – specific variation in entomopathogenic nematodes foraging strategy – dichotomy or variation along a continuum. *Fundamental and applied Nematology*, 20 (4): 393 – 398.

Campbell, J. F. and H. K. Kaya, 1999. How and why a parasitic nematode jumps. *Nature* 397: 485 – 486.

Campbell, L. R. and R. Gaugler, (1992). Effect of exsheathment on motility and pathogenicity of two entomopathogenic nematode species. *Journal of Nematology*, 24 (3): 365 – 370.

Clarke, J. and B. C. Dowds, 1995. Virulence mechanisms of *Photorhabdus* sp., strain K122 toward wax moth larvae. *Journal of invertebrate Pathology*, 66: 149 – 155.

Dirt Works 2001. Disponible en ://www.dirtworks.net/
Images/NCO/nematode/Nematodecycle.jpg. Accesado: February 2007.

Dowds, C. A. B. 1997. *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* – gene structure and expression, and genetic manipulation. *Symbiosis*, 22: 67 – 83.

Downes, M. J. and C. T. Griffin, 1996. Dispersal behaviour and transmission strategies of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis* and *Stwinernema*. Review. *Biocontrol Science and Technology*, 6: 347 – 356.

Duncan, L. W., D. C. Dunn and W. McCoy, 1996b. Spatial patterns of entomopathogenic nematodes in microcosms: implications for laboratory experiments. *Journal of Nematology*, 28 (2): 252 – 258.

Dunphy, G. B. 1995. Physicochemical properties and surface components of *Photheadus luminescens* influencing bacterial interaction with non – self response systems of nonimmune *Galleria mellonella* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 65: 25 – 34.

Entomology. University of Nebraska – Lincoln 2000. Available in: <http://entomology.unl.edu/turfent/documnts/mchafers.htm>. Accessed: february 2007

Ferguson, C. S., P. C. Schroeder and E. J. Shields, 1995. Vertical distribution, persistence and activity of entomopathogenic nematodes (Nematoda: Heterorhabditidae and Steinernematidae) in alfalfa snout beetle (Coleoptera: Curculionidae) infested fields. *Environmental Entomology*, 24 (1): 149 – 158.

Forschler, B. T. and W. A. Gardner, 1991. Concentration-mortality response of *Phyllophaga hirticula* (Coleoptera: Scarabaeidae) to tree Entomogenous Nematodes. *Journal Economic Entomology*, 84 (3): 841 – 843.

García, F. P. and A. Palomo, 1996. Natural occurrence of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Spanish soils. *Journal of invertebrate pathology*, 68:84 – 90.

Gardner, S. L., P. Stock and H. K. Kaya, 1994. A new species of *Heterorhabditis* from the Hawaiian islys. *Journal of Parasitology*, 80(1): 100-106.

Gaugler, R. 2004. Biological control trait deterioration of entomopathogenic nematodes.

Gaugler, R. y Molloy, D. 1981. Instar susceptibility of *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae) to the entomogenous nemátode *Neoplectana carpocapsae*. *Journal of Nematology*. 13: 1-5.

Gaugler, R., Lewis, E. and R. J. Stuart, 1997. Ecology in the service of biological control: the case of entomopathogenic nematodes. *Oecologia*, 109: 483 – 489.

Gaugler, R. and Kaya, H. K. 1990. Entomopathogenic nematodes in biological control, CRC Press, Boca Raton.

Genhui, Ch. and J. M. Webster, 1991. Effect of extracts of *Xenorhabdus namatophilus* on soil bacteri. *Journal of Nematology*, 23 (4): 525.

Georgi, R., H. K. Kaya and R. Gaugler, 1991. Effect of Steinernematid and Heterorhabditid nematodos (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) on nontarget arthropods. *Enviromental Entomology*, 20 (3): 815 – 822.

Glare, T. R., Jackson, T. A. and G. Zimmermann, 1993. Occurrence of *Bacillus popilliae* and two nematode pathogens in populations of *Amphimallon solstitia* (Col: Scarabaeidae) near Darmstadt, Germany. *Entomophaga*, 38(4): 441-450.

Glazer I., L. Salame and D. Segal 1997. Genetic enhancement of nematicide resistance in entomopathogenic nematodes. *Biocontrol Science and Technology* 7 (4):499-512.

Glazer, I., E. Kozodoi., L. Saleme and D. Nestel, 1996b. Spatial and temporal occurrence of natural populations of *Heterorhabditis* spp., (Nematoda: Rhabditida) in a semiarid region. *Biological Control*, 6: 130 – 136.

Glazer, I., N. Liran., G. O. Poinar and P. H Smits,. 1993. Identification and biological activity of newly isolated heterorhabditid populations from Israel. *Fundamental Applied of Nematology*, 16(5): 467-472.

Gorsuch, A. M. 1982. Regulation for the enforcement of the federal insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act exemption for regulation of certain biological control agents. *Fed. Regist* 47:23928-30

Grewal, P. S., R. Gaugler and Y. Wang 1996. Enhanced cold tolerance of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* through genetic selection. *Annals of Applied Biology* 129 (2):335-341

Grewal, P. S., S. Selvan and R. Gaugler, 1994. Thermal adaptation of nematodes: niche breadth for infection, establishment, and reproduction. *Journal of Thermal Biology*, 19: 245 – 253.

Griffin, C. T. 1993. Temperature responses of entomopathogenic nematodes: Implications for the success of biological control programmes. en *Nematodes and the biological control of insects pests*. Eds. Beeding, R., Akhurst y H. Kaya. CSIRO. p 115-135.

Hominick, W. M., A. P. Reid., D. A. Bohan and Briscoe, B. R. (1996). Entomopathogenic nematodes: biodiversity, geographical distribution and the convention on biological diversity. *Biocontrol Science of Technology*, 6: 317-331.

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

Horticulture and crop Science, OARDC/The Ohio State University. Available in: <http://ohioline.osu.edu/hyg-fact/2000/2165.html>. November 2008.

Ibarra, J. E. 1998. Comunicación personal. CINVESTAV, Irapuato, Gto.

INEGI. 2001. Anuario Estadístico de Oaxaca, tomo I y II, México, D.F.

Jackson, J. J. and M. A. Brooks, 1989. Susceptibility and immune response of western corn rootworm larvae (Coleoptera: Chrysomelidae) to the entomogenous nematode *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae). Journal of Economic Entomology. 82: 1073-1077.

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.

Jaffe, B. A. 1993. Review. Density – dependent parasitism in biological control soil – borne insects, nematodes, fungi and bacteria. Biocontrol Science and Technology, 3: 235 – 246.

Kaleli S., G. Yanik., kaya – Demirel., C.T. Erel., L.M. Senturk., A. Topçuoglu and T. Irez 2007. High rate of aneuploidy in luteinized granulosa cells obtained from follicular fluid in women who underwent controlled ovarian hyperstimulation. Fertility and sterility 2005;84(3):802-4.

Kaya, H. K. 1987. Parasitic nematodos in biological control of insect pests. Cooperative Extensión University of California. Division of Agricultura and Natural Resources Formerly Leaflet 21340.

Kaya, H. K. 1990. Soil Ecology. En: Entomopathogenic nematodes in biological control. Ed: Gaugler, R., y Kaya, H. K. CRC Press.

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

Kaya, H. K., T M., Burlando., H. Y. Choo and G. S. Thurston, 1995. Integration of entomopathogenic nematodes with *Bacillus thuringiensis* or pesticidal soap for control of insect pests. *Biological Control*, 5: 432 – 441.

Kaya, H. K. and R. Gaugler, 1993. Entomopathogenic nematodes. *Annual Review of Entomology* 38:181-206.

Koppenhofer, A. M., B. A. Jaffee and A. E. Muldoon, 1997. Suppression of an entomopathogenic nematode by the nematode – trapping by the fungi *Geniculifera paucispora* and *Monacrosporium eudermatum* as affected by the fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Mycologia*, 89 (2): 220 – 227.

Koppenhofer, A. M., B. A. Jaffee., A. E. Muldoon., D. R. Strong and H. K. Kaya, 1996a. Effect of nematode – trapping fungi on an entomopathogenic nematode originating from the same field site in California. *Journal of Invertebrate Pathology*, 68: 246 – 252.

Koppenhofer, A. M., M. E., Baur and H. K. Kaya, 1996b. Competition between two *Steinernematide* sp. Nematode for an insect host at different soil depths. *Journal of Parasitology*, 82 (1): 34 – 40.

Koppenhofer, A. M., H. K. Kaya., S. Shanmugam and G. L. Wood, 1995. Interspecific competition between steinernematid nematodes within an insect host. *Journal of Invertebrate Pathology*, 66: 99 – 103.

Koppenhofer, A. M. and H. K. Kaya, 1997. Additive and synergistic interaction between entomopathogenic nematodos and *Bacillus thuringiensis* for scarab grub control. *Biological Control*, 8:131.137.

Lacey, L. A. and M.S. Goettel, 1995. Current developments in microbial control of insect pests and prospects for they early 21st century Entomophaga, 40(1): 3-27.

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

Liu, J. and R. E. Berry, 1995a. Determination of PCR conditions for RAPD análisis in entomopathogenic nematodos (Rhabditida: Heterorhabditidae and Steinernematidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 65: 79-81.

Liu, J. and R. E. Berry, 1995b. Natural Distribution of entomopathogenic nematodos (Rhabditida: Heterorhabditidae and Steinernematidae) in Oregon soils. *Environmental Entomology*, 24(1): 159-163.

Liu, J. and R. E. Berry, 1996. *Heterorhabditis marelatus* n. sp., (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Oregon. *Journal of Invertebrate Pathology*, 67: 48-54.

Mannion, C. M. and R. K. Jansson, 1992. Movement and postinfection emergence of entomopathogenic nematodes from sweet potato weevil, *Cylas formicarius* (F) (Coleoptera: Apionidae). *Biological Control*, 2: 297 – 305.

Matson, P. A., W.S. Parton., A.G. Power and M. J. Swift, 1997. Agricultural intensification and ecosystem properties *Science*, 229:1993 – 1994

Morón, M. A. 1986. El género *Phyllophaga* en México. Morfología, distribución y sistemática supraespecífica (Insecta: Coleoptera). Pub. 20. Instituto de Ecología. México. 344 pp.

Morón, M. A., S. Hernández-Rodríguez and A. Ramírez-Campos. 1999 Description of immature stage of *Phyllophaga* (*Triodonyx*) *lalanza* Saylor (Coleoptera: Melolonthidae, Melolonthinae). *Pan-Pacific Entomologist.*, 75(3): 153-158

Mracek, Z., E. H. Arteage and N E. Boemare, 1994. *Steinernema cubana* sp. (Nematoda: Rhabditida: steinernematidae) and the preliminary characterization of its associated bacterium. *Journal of Invertebrate Pathology*, 64: 123-129.

Mracek, Z., A. Bednarek and J. M. Webster, 1991. Cuticular Structure of the J2 and J3 juveniles of the entomophilic family heterorhabditidae. *Journal of Nematology*, 23(4): 543.

Mracek, Z. and J. M. Webster, 1993. Survey of Heterorhabditidae and Steinernematidae (Rhabditida, Nematoda) in western Canada. *Journal of Nematology*, 25(4):710-717.

Myers, J. H., J. N. M. Smith and J. S. Elkinton, 1994. Biological control and refuge theory. *Technical comments. Science*, 265, 811.

Nguyen K. B. and G. C. Smart Jr. 1996 identification of Entomopathogenic nematodes in the *Steinernematidae* and *Heterorhabditidae* (Nematoda: Rhabditida) *Journal of Nematology* 28:286-30

Nguyen, K. B. and G. C. Smart, 1990. *Steinernema scapterisci* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae). *Journal of Nematology*, 22(2): 267-268.

Nguyen, K. B. and G. C. Smart 1992a. Addendum to the morphology of *Steinernema scapterisci*. *Journal of Nematology*, 24(4): 478-481.

Nguyen, K. B. and G. C. Smart, 1992b. life cycle of *Steinernema scapterici*. Journal of Nematology, 24 (1): 160 -169.

Nguyen, K. B. and G. C. smart, 1992c. *Steinernema neocurtillis* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae) and a key to species of the genus *Steinernema scapterici* Journal of Nematology, 24(4): 463-477.

Nguyen, K. B. and G. C.Smart, 1993a. Location of the phasmids on infective juveniles of *Steinernema glaseri*. Journal of Nematology, 25(4): 625-627.

Nguyen, K. B. and G. C. Smart, 1993b. Scanning electrón microscope studies of *Steinernema anomali* Kozodoi, (1984). Journal of Nematology, 23(3): 486-492.

Nguyen, K. B. and G. C. Smart, 1995. Morphometric of infective juveniles of *Steinernema* spp. And *Heterorhabditis bacteriophora* (Nemata: Rhabditida). Journal of Nematology, 27(2): 206-212.

Parkman, J. P. and G. C. Smart, 1996. Entomopathogenic nematodes, a case study: introduction of *Steinernema scapterisci* in Florida. Biocontrol Science and Technology, 6: 413 – 419.

Pedigo, L. P 1996. Management with natural enemies. En: Entomology & Pest Management. Second Edition. (Prentice-Hall Inc.) pp. 301 – 328.

Peters, A. 1996. The natural host range of *Steinernema* and *Heterorhabditis* spp. and their impact on insect populations. Review. *Biocontrol Science and Technology*, 6: 389-402.

Poinar, Jr. G. O. 1990. Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. En: *Entomophagous nematodes in biological control*. Ed: Gaugler, R., and H. K. Kaya., pp. 23-61. CRC Press.

Ramírez-Salinas, C. y A. Castro-Ramírez. 1998. Estudio morfológico del estado larval de seis especies de *Phyllophaga* (Coleoptera: Melolonthidae) de la región Altos de Chiapas, México. Pp. 37-50. *In: Morón, M.A. y A. Aragón (Eds.). Avances en el estudio de la diversidad, importancia y manejo de los coleópteros edafícolas americanos*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y Sociedad Mexicana de Entomología, Puebla, México.

Ramírez-Salinas, C., M. A. Morón y A. Castro-Ramírez. 2000. Descripción de los estados inmaduros de seis especies de *Phyllophaga* (Coleoptera: Melolonthidae, Melolonthinae) de la región Altos de Chiapas, México. *Folia Entomologica Mexicana*, 109:73-106.

Rodríguez del Bosque, L. A. 1988. *Phyllophaga crinita* Burmeister (Coleoptera: Melolonthidae): Historia de una plaga del suelo (1855-1988). Pp. 53-79. *In: Memorias de la III Mesa Redonda sobre Plagas del Suelo*. Sociedad Mexicana de Entomología. Morelia, Michoacán, México.

Rueda, L. M., S. O. Oswaru., L. L. Georgi and R. E. Harrison, 1993. Natural occurrence of entomogenous nematodes in Tennessee nursery soils. *Journal of Nematology*, 25(2): 181-188.

Schroeder, P. C., M. G. Villani., C. S. Ferguson., J. P. Nyrop and E. J. Shields, 1993. Behavioral interactions between Japanese beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) grubs and an entomopathogenic nematode (Nematoda: Heterorhabditidae) within turf microcosms. *Environmental Entomology*, 22 (3): 595 – 600.

Segal and Glazer, 2000. Genetics for improving biological control agents: the case of entomopathogenic nematodes. *Crop protection*, 19:685-689.

Selvan. S., P. S. Grewal., T. Leustek and R. Gaugler, 1996. Heat shock enhances thermotolerance of infective insect-parasitic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae). *Experientia*, 52: 727-730.

Shapiro, D. I. y Glazer, I. 1995. Effects of earthworms on the dispersal of the *Steinernema* spp. *Journal of Nematology*, 27 (1): 21 – 28.

Shapiro, D. I. and I. Glazer, 1996. Comparison of entomopathogenic nematode dispersal from infected hosts versus aqueous suspension. *Environmental Entomology*, 25 (6): 1455 – 1461.

Shapiro-Llan, D. I., R. J. Stuart and C. W. McCoy. 2005. Characterization of biological control traits in the entomopathogenic nematode *H. mexicana* (MX4 strain). *Biological Control*. 32: 97-103.

Shetlar, D. J., P. E. Suleman and R. Georgis, 1988. Irrigation and use of entomogenous nematodes *Neoplectana* spp. And *Heterorhabditis heliothidis* (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) for of Japanese beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) grubs in turfgrass. *Journal of Entomological Science*, 81: 1388.

Simberloff, D. and P. Stiling, 1996. How risky is biological control *Ecology*, 77 (7): 1965 – 1974.

Simoes, N. and J. S. Rosa, 1996. Patogenicity and host specificity of entomopathogenic nematodes. Review. *Biocontrol Science and Technology*, 6: 403-411.

Sosa, O. Jr. Y Hall, D. G. 1989. Mortality of *Ligyurus subtropicus* (Coleoptera: Scarabaeidae) in sugarcante. *Environmental Entomology*, 14: 80 – 82.

Stock, S. P. 1997. *Heterorhabditis hepialus* Stock, Strong & Gardner, 1996 a junior synonym of *H. Marelatus* Liu & Berry, (1996) (Rhabditida: Heterorhabditidae) with a redescription of the species. *Nematologica*, 43: 455-462.

Stock, S. P., H. Y. Choo and H. K. Kaya, 1997. An entomopathogenic nematode *Steinernema monticolum* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae) from Korea with a key to other species. *Nematologica*, 43: 15-29.

Stock, S. P. and H. K. Kaya, 1996. A multivariate analysis of morphometric characters of *Heterorhabditis* species (Nemata: Heterorhabditidae) and the role of morphometrics in the taxonomy of species of the genus. *Journal of Parasitology*, 82(5): 806-813.

Strauch, O., J. Oestergaard, S. Hollmer and R. U. Ehlers. 2004. Genetic improvement of the desiccation tolerance of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* through selective breeding. *Biological Control* 31(2): 218-226.

Tachibana, M., H. Hori., S. Nobukazu., T. Uechi., D. Kobayashi., H. Iwahana and H. K. Kaya, 1996. Larvicidal activity of the symbiotic bacterium *Xenorhabdus japonicus* from the entomopathogenic nematode *Steinernema kushidai* against *Anomala cuprea* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 68: 154 – 159.

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

Tew, J. 2000. Wax Moth Control in Bee Hives. Disponible en <http://ohioline.osu.edu/hyg-fact/2000/2165.html>

Thomas, G. M. and G. O. Poinar, Jr. 1979. *Xenorhabdus* gen. Nov., a genus of entomopathogenic nematophilic bacteria of the family Enterobacteriaceae. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 29: 352 – 360.

Thomas, W. K. 1998. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature*, 392: 71-75.

Timper, P. and H. K. Kaya, 1992. Impact of a nematode – parasitic fungus on the effectiveness of entomopathogenic nematodes. *Journal of Nematology*, 24 (1): 1 – 8.

Villalobos, F. J. 1998. Bioecology and sustainable management of white grubs (Coleoptera: Melolonthidae) pest of corn in “El Cielo” Biosphere Reserve, Tamaulipas, Mexico. Pp. 173-184. *In: Morón, M. A. y A. Aragón (Eds.). Avances en el estudio de la diversidad, importancia y manejo de los coleópteros edafícolas americanos*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y Sociedad Mexicana de Entomología, Puebla, México.

Yeh, T. and S. R. Alm., 1992. Effect of entomopathogenic nematode species, rate, soil, moisture, and bacteria on control of Japanese beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae in the laboratory. *Journal of Economic Entomology*, 85 (6): 2144 – 2148.

Yi, W., J. F. Campbell and R. R. Gaugler, 1995. Infection of entomopathogenic nematodes *Steinernema glaseri* and *Heterorhabditis bacteriophora* against *Popillia*

japonica (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae. Journal of Invertebrate Psthology, 66: 178 – 184.

Zioni, S., I. Glazer and D. Segal, 1992. Life cycle and reproductive potencial of the nematode *Heterorhabditis bacteriophora* strain HP88. Journal of Nematology, 24(3): 352 – 358.