

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



Nematodos Entomopatógenos del Noreste de México y su Patogenicidad y
Virulencia sobre *Tenebrio molitor* L.

Por:

EDUARDO HIDALGO MAYORGA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Saltillo, Coahuila, México

Marzo 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

Nematodos Entomopatógenos del Noreste de México y su Patogenicidad y
Virulencia sobre *Tenebrio molitor* L.

Por:

EDUARDO HIDALGO MAYORGA

TESIS

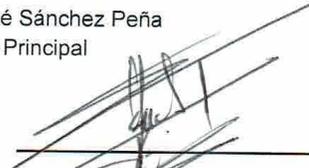
Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Aprobada por el Comité de Asesoría:



Dr. Sergio René Sánchez Peña
Asesor Principal


M.C. Diego Alejandro Treviño Cueto
Coasesor
Dr. Gabriel Gallegos Morales
Coasesor
Dr. Gabriel Gallegos Morales
Coordinador de la División de Agronomía

Coordinación
División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México

Marzo 2018

AGRADECIMIENTOS

A DIOS, por haberme permitido concluir una meta más en mi vida y forjarme con buenos valores en el transcurso de mi vida.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, por recibirme en su nicho de estudios, y brindarme las facilidades para empezar esta meta propuesta, al departamento de parasitología agrícola por permitirme pertenecer a este mismo, y así obtener todos sus beneficios de su programa.

Al Dr. Sergio Rene Sánchez Pérez, por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto, por la dedicación, atención presentada, apoyo, por los consejos y conocimientos sugeridos.

Al M.C. Diego Alejandro Treviño Cueto, por todos los conocimientos, consejos y asesoría brindaba, en el transcurso de la realización de este proyecto, por su tiempo invertido en esta investigación a pesar de los múltiples trabajos y ocupaciones, estuvo dispuesto para que esto terminara satisfactoriamente.

Al M.C. José Francisco Rodríguez Rodríguez, por la asesoría proporcionada en este trabajo.

Al Dr. Gabriel Gallegos Morales, por la asesoría brindada y formar parte del mismo comité.

A mis profesores del departamento de parasitología, por brindarme de sus conocimientos, experiencias y consejos en mi estancia de estudiante, y así poder enfrentar de manera eficiente el ámbito profesional y desarrollarme de manera eficiente en un futuro.

A todos mis amigos, que formaron parte de mi formación como profesionista.

DEDICATORIA

A mi madre Sra. Olga Mayorga Galindo, madre mía usted que me dio la vida, que me aconsejó, me enseñó buenos valores para enfrentar la vida y gracias a esos valores que me formaron en la persona que ahora soy, gracias mamita por cada una de sus oraciones por tantas noches de desvelo a mi lado, por estar conmigo en las situaciones malas y buenas, por sus motivaciones para que siguiera con mi meta, por tratarme como siempre lo ha hecho, por creer en mí. Siempre estaré agradecido con dios por tenerla a mi lado y pidiéndole con gran deseo que me dé la dicha de tenerla muchos años más.

A mis hermanos Jorge Hidalgo Mayorga, a ti hermano querido por tus consejos, apoyo en esta meta, por tu motivación a seguir adelante gracias.

Moisés Hidalgo Mayorga, a ti hermano querido por creer en mí siempre, y apoyarme de alguna manera, por tus ánimos gracias.

Brigette Hidalgo Vázquez, a ti sobrina por ser unas de mis motivaciones para poder concluir esta etapa.

A mis abuelitos, Vitaliano Hidalgo Tirado (†), Elena Reyes García, por brindarme todo su apoyo, por ser como mi segunda madre, por estar conmigo en los tiempos difíciles, por aconsejarme cada día, por el cariño demostrado en mi niñez y en mi adolescencia gracias.

A mi familia, tíos Elena Hidalgo Reyes, Delia Hidalgo Reyes, Orlando Hidalgo Reyes, Rafael Carreón Aguilar, Magner Rubito Roblero Díaz, que confiaron en mí, me brindaron incondicionalmente su apoyo, siempre preocupándose de mí, primos Madeli Roblero hidalgo, Iván Roblero Hidalgo, Jesús Carreón Hidalgo, que confiaron en mí, saben cómo sacarme una sonrisa siempre, la hoja no me alcanzara para agradecer a toda mi familia, pero expreso mi más sincero agradecimiento y dedicatoria a todos los que contribuyeron en mi formación profesional.

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA	ii
ÍNDICE DE CUADROS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	vii
INTRODUCCIÓN	1
Justificación	4
Objetivo general.....	4
Objetivos específicos.....	4
Hipótesis	4
REVISIÓN DE LITERATURA	5
Nematodos	5
Nematodos entomopatógenos.....	5
Características de la Clase Secernentea.....	8
Características: Orden Rhabditida	8
Características del género <i>Heterorhabditis</i>	9
Morfología.....	9
Ciclo de vida y Patogenicidad.....	10
Como actúa dentro del insecto	11
Sintomatología.....	11
Especies de <i>Heterorhabditis</i> y bacteria mutualista	12
Características del género <i>Steinernema</i>	12
Morfología.....	13
Ciclo de Vida y Patogenicidad	13
Como actúan dentro del insecto	14
Sintomatología.....	15
Especies de <i>Steinernema</i> y bacteria asociada	15
Métodos de producción de nematodos entomopatógenos	16

Producción de nematodos entomopatógenos usando a <i>Tenebrio molitor</i> como reactor biológico	17
Virulencia	18
Importancia de las plagas del suelo	18
MATERIALES Y MÉTODOS	20
Localización del área del experimento.....	20
Reactivación de cepas entomopatógenas y origen	20
Identificación de género de nematodos	20
Bioensayo de patogenicidad y virulencia <i>in vitro</i> contra <i>Tenebrio molitor</i>	21
Análisis de datos	22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
Sintomatología observada en la reactivación de cepas corroborando la identificación.....	23
Bioensayo de patogenicidad y virulencia	25
Dosis letal media de las cepas evaluadas contra larvas de <i>Tenebrio molitor</i>	25
Mortalidad sobre <i>Tenebrio molitor</i> causada por las cepas de nematodos entomopatógenos	26
Comparación de medias de mortalidad sobre <i>Tenebrio molitor</i>	35
CONCLUSIONES	37
LITERATURA CITADA.....	39
APÉNDICE	46
Apéndice 1.....	46
Apéndice 2.....	47
Apéndice 3.....	49
Apéndice 4.....	50
Apéndice 5.....	51
Apéndice 6.....	52

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Especies descritas de los géneros <i>Steinernema</i> y <i>Heterorhabditis</i> como nematodos entomopatógenos.....	7
Cuadro 2. Especies de <i>Heterorhabditis</i> y bacteria mutualista.....	12
Cuadro 3. Especies de <i>Steinernema</i> y bacteria asociada.....	15
Cuadro 4. Sintomatología observados en <i>Tenebrio molitor</i> para confirmar el género de la cepa evaluada	24
Cuadro 5. Efectividad biológica en dosis letal media sobre <i>Tenebrio molitor</i> por cepa	26
Cuadro 6. Mortalidad de la cepa M5 <i>Steinernema</i> spp., sobre <i>Tenebrio molitor</i> ..	27
Cuadro 7. Mortalidad de la cepa M6 <i>Steinernema</i> spp., sobre <i>Tenebrio molitor</i> ..	28
Cuadro 8. Mortalidad de la cepa B7 <i>Steinernema</i> spp., sobre <i>Tenebrio molitor</i> ...	30
Cuadro 9. Mortalidad de la cepa MZ9 <i>Heterorhabditis</i> spp., sobre <i>Tenebrio molitor</i>	31
Cuadro 10. Mortalidad de la cepa M18 <i>Heterorhabditis</i> spp., sobre <i>Tenebrio molitor</i>	32
Cuadro 11. Mortalidad de la cepa MZ6 <i>Heterorhabditis</i> spp., sobre <i>Tenebrio molitor</i>	34
Cuadro 12. Comparación de medias de la mortalidad sobre <i>Tenebrio molitor</i> entre cepas evaluadas en tiempo de 24 horas.....	35
Cuadro 13. Comparación de medias de la mortalidad sobre <i>Tenebrio molitor</i> entre cepas evaluadas en tiempo de 48 horas.....	36
Cuadro 14. Comparación de medias de la mortalidad sobre <i>Tenebrio molitor</i> entre cepas evaluadas en tiempo de 72 horas.....	36
Cuadro 15. Comparación de medias de la mortalidad sobre <i>Tenebrio molitor</i> en dosis por tiempos de 24, 48, 72 horas	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. A), juvenil infectivo de tercer estadio de <i>Heterorhabditis</i> spp., B), juvenil infectivo conservando la cutícula del J2 (INIAP, 2014).	10
Figura 2. B), Juvenil infectivo del tercer estadio de <i>Steinernema carpocapsea</i> A), muestra la cutícula del segundo estadio (arriba) (INIAP, 2014).	13
Figura 3. Porcentaje de mortalidad cepa M5 <i>Steinernema</i> spp.....	28
Figura 4. Porcentaje de mortalidad cepa M6 <i>Steinernema</i> spp.....	29
Figura 5. Porcentaje de mortalidad cepa B7 <i>Steinernema</i> spp.	31
Figura 6. Porcentaje de mortalidad cepa MZ9 <i>Heterorhabditis</i> spp.	32
Figura 7. Porcentaje de mortalidad cepa M18 <i>Heterorhabditis</i> spp.....	33
Figura 8. Porcentaje de mortalidad cepa MZ9 <i>Heterorhabditis</i> spp.	35

RESUMEN

Los nematodos entomopatógenos son organismos que poseen características que los hacen sobresalientes para su uso en el control biológico de plagas. Una de las características más importante es la simbiosis con bacterias (*Xenorhabdus* spp., y *Photorhabdus* spp.), que en conjunto les proporcionan su alta virulencia contra insectos plaga. El objetivo de este trabajo fue determinar la patogenicidad y virulencia de nematodos entomopatógenos nativos del Noreste de México sobre el insecto modelo *Tenebrio molitor* bajo condiciones *in vitro*. Se inició con la reactivación de seis cepas, con la finalidad de determinar la patogenicidad y contar con juveniles infectivos para el bioensayo de virulencia. Aplicando suspensión de 500 μ l de solución agua nematodo a cada larva de *Tenebrio molitor* en cámaras de infección. Comprobando la patogenicidad de las seis cepas y producción de los juveniles infectivos en las larvas. En el bioensayo de virulencia se determinó la dosis letal media (DL₅₀) para cada cepa. Se utilizaron larvas de ultimo instar de *Tenebrio molitor*, aplicando dosis de 10, 25, 50, 100 y 200 juveniles infectivos/larva y un testigo en cámaras de infección previamente realizadas. Se registró la mortalidad en tres tiempos (24, 48 y 72 h). De acuerdo con el análisis Probit, la mejor dosis letal para causar mortalidad del 50% fue para la cepa MZ9 *Heterorhabditis* spp., de (DL₅₀) 4 juveniles infectivos/larva en tiempo de 48 h. Comparando la mortalidad entre cepas, de acuerdo al análisis Anova, *Steinernema* spp., (cepa M5) causó la mayor mortalidad del 100% en dosis de 25, 50, 100 y 200 Juveniles infectivos/larva en 72 h. contrario a la cepa MZ9 *Heterorhabditis* spp., causó la menor mortalidad de 15.16% con dosis de 50 juveniles infectivos/larva en tiempo de 24 h. Por lo tanto las cepas nativas evaluadas mostraron alta actividad larvicida comprobando que es factible la incorporación en programas de manejo integrado de plagas.

Palabras claves: Control biológico, nematodos entomopatógenos, patogenicidad, virulencia, *Steinernema* spp., *Heterorhabditis* spp., *Tenebrio molitor*.

INTRODUCCIÓN

El control biológico se ha basado como una estrategia de manejo de plagas a través de la utilización de organismos vivos, como parasitoides, depredadores y patógenos, sabiendo que este tiene un campo de combate extenso y específico. Es una herramienta de gran utilidad en los programas de manejo integrado de plagas, por sus ventajas y beneficios que genera, lo han considerado como la primera opción de control, ayudando a minimizar el desequilibrio ecológico de un ecosistema (Rodríguez, 2012).

Una parte muy importante la constituye el control microbiano, en donde el uso de organismos entomopatógenos como: nematodos, hongos, bacterias, virus y protistas patógenos de insectos terrestres, han cobrado importancia en los últimos años en el manejo integrado de plagas. Reportes de varios investigadores han demostrado que los microorganismos entomopatógenos son comunes y se encuentran ampliamente distribuidos en todos los suelos de los continentes y han sido aislados de una diversidad de ecosistemas para conocer parte de su biología, morfología y distribución e integrarlos como agentes microbianos de control. El impacto mundial que ha generado esta alternativa se ve reflejado en el campo mexicano, manifestando avances en la agricultura, el cual ha permitido impulsar el manejo de agentes microbianos para el control de insectos plaga (Lacey *et al.*, 2001).

La nematología es una de las disciplinas que destaca con más esfuerzos dentro de la patología de insectos. Este interés puede ser atribuible a los recientes éxitos con la utilización que generan los nematodos como método de control biológico para el combate contra plagas de insectos de importancia económica. Se conoce un número amplio de asociación entre nematodos e insectos que comprenden más de 30 familias de nematodos pertenecientes a siete ordenes, seis de la clase Secernentea, Rhabditida, Tylenchida, Aphelenchida, Strongylida, Oxyurida,

Ascaridida y el orden Mermithida perteneciente a la clase Adenophora (Kaya y Gaugler, 1993).

En la actualidad el interés sobre los nematodos entomopatógenos de insectos se ha aumentado en las dos últimas décadas, mostrando resultado positivo en miles de investigaciones realizadas en el mundo, poniéndoles como agentes promisorios para el control de insectos, moluscos, nematodos de plantas y algunos patógenos de plantas que se encuentran en el suelo (Grewal *et al.*, 2005).

Las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae son las consideradas entomopatógenas, poseen características que los hacen sobresalientes para el uso en control microbiano, como capacidad de adaptación a nuevos ambientes y a condiciones adversas, resistencia a productos químicos, alta especificidad por insectos, inocuidad al ambiente, mamíferos y compatibilidad con otros entomopatógenos, resultando su importancia de control en programas de manejo integrado de plagas (Sáenz, 2005).

Los nematodos entomopatógenos que habitan el suelo, se presentan ampliamente distribuidos en diferentes ecosistemas terrestres en todos los continentes, con excepción en la Antártida (Ngo-Kanga, *et al.*, 2012). Estos son reconocidos con potencial para el manejo de insectos con hábitat críptico como barrenadores y algunas plagas edafícolas o que presentan alguna fase de desarrollo en el suelo (Gaugler, 2002 y Alatorre, 2012). La mayor cantidad de las especies de nematodos entomopatógenos de uso actual en la agricultura tienen procedencia de Estados Unidos de América (EUA) (IPN, 2014).

En México, es poca la información con respecto al potencial de identificación y distribución de nematodos entomopatógenos nativos, que pueden permitir la selección de aislamientos promisorios como alternativa de control de plagas. Se tiene conocimiento solamente en México de la cepa *Steinernema carpocapsae*, que originalmente fue aislada de larvas infectadas de la palomilla de la manzana *Cydia pomonella*, en Allende, Chihuahua por Caltagirone (Poinar, 1990). Es posible que muchas especies adicionales pueden ser descubiertas, debido a la metodología

practica de encontrar especies de Nematodos adaptados localmente, ya que usualmente tienen determinado una base geográfica (Salas *et al.*, 2000).

Por lo que se considera que el éxito de los nematodos entomopatógenos depende del uso de cepas nativas aisladas de cada región en específico para tener un mejor control de las plagas nativas. Aunque existen diferentes factores claves para incrementar su efectividad al momento del combate, como el conocimiento y hábitos del insecto plaga, adicionalmente factores ambientales como la temperatura, humedad y textura del suelo González (2006). Este trabajo será determinar la patogenicidad y virulencia de cepas nativas del Noreste de México sobre el insecto modelo *Tenebrio molitor*.

Justificación

Con el fin de incorporar el uso de nematodos entomopatógenos en programas de control biológico, es necesario seleccionar cepas que presenten mayor efectividad y adaptabilidad en cuanto a una región geográfica en específico.

Objetivo general

Determinar la patogenicidad y virulencia de nematodos entomopatógenos nativos del Noreste de México sobre *Tenebrio molitor* bajo condiciones *in vitro*.

Objetivos específicos

- ✚ Evaluar la patogenicidad y virulencia de diferentes cepas de nematodos entomopatógenos
- ✚ Calcular la dosis letal media (DL_{50}) de las cepas evaluadas sobre larvas de *Tenebrio molitor*.

Hipótesis

Por lo menos una cepa de nematodos entomopatógenos será estadísticamente más patogénica y virulenta sobre *Tenebrio molitor*.

REVISIÓN DE LITERATURA

Nematodos

Los nematodos son organismos vivos filiformes, poseen cabeza con aparato bucal terminal y cola terminada en punta para algunas especies. El tracto digestivo consiste en un estómago y esófago, que juntos disponen una tercera parte del total del cuerpo de este. En la parte posterior, el intestino ocupa otras dos partes. Las gónadas de la hembra constituyen una vulva (vagina) uno de los dos oviductos y ovarios que se extienden anteriormente y posteriormente de donde la vulva se localiza. Los nematodos juveniles estos no poseen estructuras genitales externas. El ciclo de vida está constituido de tres estados de desarrollo los cuales son: huevo, juvenil, adulto. Los huevos son de tamaño microscópicos, los adultos hembras pueden ser identificados por una abertura ventral de la vulva cerca de la mitad del cuerpo o hacia la cola. También se pueden identificar por la presencia de huevos o nematodos jóvenes en su interior de su cuerpo. Los adultos machos son distinguidos por la presencia de espículas en la región de la cola y por su estructura aplanada o hinchada de la cola (Castillo, 1995 y Cepeda, 1997).

Nematodos entomopatógenos

La relación que existe entre hospedero-nematodo se ha determinado en diferentes hábitats, estudiando la atracción del nematodo hacia el hospedero, las fuentes de alimentación, como la influencia de estímulos químicos. Se ha determinado diferentes asociaciones entre los nematodos y los insectos, siendo las más influyentes: forosis, parasitismo facultativo, parasitismo obligado (Alves, 1986).

Diversos estudios de investigación concuerdan que los nematodos son atraídos por los insectos por la presencia de Dióxido de Carbono (CO₂), la temperatura que presentan los insectos por su cuerpo, la presencia de las bacterias *Xenorhabdus*

spp., y *Photorhabdus* spp., en el nematodo, componentes fecales del insecto y el plasma del insecto hospedero. El grado que genera esta atracción depende entre las especies del insecto hospedero (López s/f y Arredondo *et al.*, 1999).

Las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae se consideran como nematodos entomopatógenos estas muestran una asociación simbiótica con bacterias específicas del género *Xenorhabdus* spp., y *Photorhabdus* spp., respectivamente, ubicándose únicamente en el intestino de los juveniles infectivos. Probando en su totalidad la patogenicidad y virulencia de ambas familias. Los nematodos se alimentan de la misma bacteria y del cadáver en descomposición del insecto hospedero, estos se reproducen de dos a tres generaciones aun dentro del cadáver para completar su desarrollo y emergen como juveniles de tercer estadio o juveniles infectivos, posteriormente dispersándose dentro del suelo en búsqueda de nuevos insectos hospederos (Alatorre, 2012).

El uso de nematodos entomopatógenos actualmente es como agentes microbianos por su alto potencial de control biológico, infectado a los órdenes Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Orthoptera, Hymenoptera e Isoptera. Entre las especies más relevantes se reportan algunas que tienen un alto índice de insectos hospederos, el cual han sido eficientes en el control del mismo. Siendo las siguientes:

- ✚ *Steinernema carpocapse* infecta a más de 250 especies de insecto, pertenecientes aproximadamente a 75 familias que se extiende a casi 11 órdenes de insecto (Poinar, 1979).
- ✚ *Steinernema scapterisci* esta especie se utiliza en el control biológico clásico contra grillos topos (Nguyen y Smart, 1990).
- ✚ *Scapteriscus vicinus* especie de la cual parasita termitas y otros ortópteroideos (Nguyen y Smart, 1992).

Nguyen (1999) mencionó algunos géneros y especies descritas de nematodos entomopatógenos que tienen mucho énfasis de infección hacia algunos géneros de insectos tales especies como:

Cuadro 1. Especies descritas de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis* como nematodos entomopatógenos

Genero	Especie
<i>Heterorhabditis</i>	<i>Argentinensis, bacteriophora, hepialus, megidis, marelatus.</i>
<i>Steinernema</i>	<i>abbasi, affine, arenarium, bicornutum, caudatum, ceratophorum, cubanum, intermedium, glaseri, kari, kushidai, kraussei, longicaudum, monticolum, neocurtillae, oregonense, puertoricens, rarum, riobrave, scapterisci, siamkayai.</i>

López (s/f) mencionó que los nematodos entomopatógenos tienen importancia en el manejo de los siguientes insectos plaga *Fungus gnatus*, *Bradysia* spp., que son plagas en ornamentales producidas bajo invernaderos, el cual daña la corteza en las ornamentales y reduce el vigor de las plantas. Como también picudos barrenadores en cítricos *Diaprepes abbreviatus*, *Artipus floridanus* y el picudo radical de los cítricos *Pachnaeus litus*, *P. opalus* también *Otiorynchus ovalus* y *O. sulcatus* o picudos de los viñedos en cultivos de moras y fresas, algunas plagas tales como *Heliothis zea*, *Spodoptera frugiperda* y el trozador negro *Agrotis ipsilon*.

Lezama *et al.* (1996) reportaron que la susceptibilidad de larvas de *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) a diversos nematodos entomopatógenos de las familias (Steinernematidae y Heterorhabditidae). Se demostró que la plaga es susceptible en diferentes grados a los nematodos probados; *Steinernema riobrave* y *S. carpocapsae* cepa All mataron un 90% de larvas y pupas; mientras tanto *Heterorhabditis bacteriophora* cepa NC mataron un 82.5% de larvas y pupas; *S. feltiae* el 81.25%; la cepa *S. carpocapsae* Tecomán causo el 76% de mortalidad, mientras que *H. bacteriophora* Tecomán y *S. glaseri* el 52.5%. Estos resultados surgieron para determinar que las especies *S. riobrave* y *S. carpocapsae* cepa All tienen mayor potencial como agentes microbianos de control biológico contras larvas y pupas de *Anastrepha ludens*.

Características de la Clase Secernentea

Generalmente presentan fasmidios, los anfidios pares de órganos quimiotáxicos localizados lateralmente sobre la cabeza o anteriores al cuello son generalmente pequeños en forma de poro, raras veces ovaladas, como una ranura, en posición anterior a los labios. Carecen de glándulas caudales. Órganos sensoriales de la cabeza, papilas muy raramente setosas. El estilete tiene protuberancias basales y abre ventralmente. Esófago: tielencoide, afenlencoide, rhabditoide. Machos usualmente con Bursa, a veces con un poro de papilas genitales. Sistema excretor con uno o dos glándulas, subventrales con canales laterales presentes y en la parte terminal del conducto cuticularizado. Deiridios presentes (Yepez, 1972).

Características: Orden Rhabditida

Algunas especies de Rhabditidos asociados a insectos actúan como parásitos facultativos, mientras otros presentan relaciones foréticas (Poinar, 1975). Dentro de las formas parasíticas destacan las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae, las cuales han desarrollado un estado parasítico especial en el cual buscan a su huésped activamente y penetran hasta llegar al hemocele del insecto, ambas familias están asociadas mutualistamente a las bacterias *Xenorhabdus* spp., y *Photorhabdus* spp., respectivamente, que las conlleva a ser de mayor virulencia para ambas familias (Arredondo *et al.*, 1999).

Los estadios infectivos de estos nematodos presentan atributos tanto parásitos como entomopatógenos. Cuando actúan como parásito les ayuda los quimiorreceptores que ellos tienen y son móviles, como patógenos tienen la capacidad de ser muy virulentos, matando a sus huéspedes rápidamente (Kaya y Gaugler, 1993). El uso de los nematodos entomopatógenos en la agricultura son seguros ya que estos no causan ningún daño a las plantas, vertebrados y otros invertebrados (Poinar, 1989).

Características del género *Heterorhabditis*

Según Poinar (1976) clasifico a *Heterorhabditis* como género, perteneciendo al orden Rhabditida, familia Heterorhabditidae. Guzmán y Alatorre (1999) reportaron que la familia Heterorhabditidae son patógenos obligados de insectos que matan a su huésped. Desarrollando dos generaciones en el insecto. Siendo hermafroditas en la primera generación, amfimicticos (partición de machos y hembras) en la segunda generación. Esta familia fue establecida con *H. bacteriophora* como especie tipo.

Morfología

Los infectivos juveniles, tienen localizado el poro excretor posterior al anillo nervioso. Los machos presentan Bursa, espículas apareadas y separadas, nueve pares de papilas genitales y gubernáculo presente. Tienen seis labios que pueden estar parcialmente fusionados en la base, cada labio con una única papila labial. Los *Heterorhabditis* spp., presentan una asociación mutualista con la bacteria *Photorhabdus luminescens*. Tienen una alta capacidad de parasitar la mayor parte de órdenes y familias de insectos considerados plaga, se pueden cultivar de forma *in vivo* o *in vitro* de manera masiva sobre medios de cultivos artificiales y los estadios infectivos tienen la capacidad de conservar infectividad cuando son almacenados por un largo tiempo (George y Poinar, 1979).

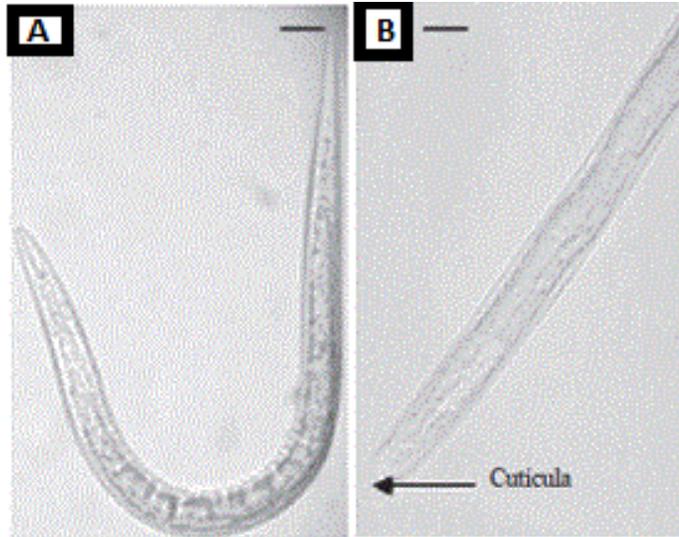


Figura 1. A), juvenil infectivo de tercer estado de *Heterorhabditis* spp., B), juvenil infectivo conservando la cutícula del J2 (INIAP, 2014).

Ciclo de vida y Patogenicidad

Los Heterorhabditidos inician la infección en el tercer estado juvenil (J3), este está adaptado morfológicamente y fisiológicamente para permanecer en el medio ambiente sin alimentarse durante periodos largos. Durante las adaptaciones morfológicas se hace mención el aparato digestivo, el cual no es funcional la boca y el ano están cerrados. La bacteria simbiótica *Photorhabdus luminescens* presenta un papel nutricional importante dentro del huésped, además de matar rápidamente al insecto plaga, permite a los nematodos tener un amplio rango de huéspedes (Poinar, 1979). El estado infectivo del nematodo está adaptado para buscar y sobrevivir en el suelo, pero existe unas limitantes que dificultan el movimiento del mismo, esto se basa por el tipo de suelo donde se encuentre y la humedad microambiental. Se reportó que *H. bacteriophora* realiza la búsqueda de su huésped cerca de la superficie del suelo (Alatorre y Kaya, 1990).

Los infectivos juveniles tienen la capacidad de buscar activamente a su huésped, ocurriendo está en respuesta a estímulos físico, químicos producidos por el huésped

(gradientes de CO₂, temperatura del hospedero, producto de excreciones del huésped) (Gaugler *et al.*, 1991).

Choo *et al.* (1989) propusieron en base a la habilidad para localizar a su huésped, que los Heterorhabditidos tienen mayor habilidad que los Steinernamatidos, pero cabe mencionar que dicha habilidad de búsqueda se puede incrementar seleccionando poblaciones de nematodos a través de varias generaciones.

La forma de penetración al huésped son por la boca, ano y espiráculos sin embargo *Heterorhabditis* spp., posee un diente dorsal el cual utiliza para romper la cutícula del insecto y poder entrar directamente al hemocele (Guzman y Alatorre, 1999).

La reproducción de (juvenil a juvenil) tarda 12 días. El J3 abandona el cadáver en busca de nuevo huésped, los juveniles infectivos no se alimentan pero pueden sobrevivir varias semanas de la sustancia que tienen almacenadas como reservas y por varios meses al entrar en estado anhidrobiótico (Womersley y Gaugler, 1990).

Como actúa dentro del insecto

Los infectivos juveniles que invaden el hemocele del huésped liberan la bacteria simbiótica *Photorhabdus luminescens* que coloniza rápidamente al insecto, derivándole la muerte por septicemia durante un periodo de 48 a 72 horas. Al mismo tiempo la bacteria produce antibióticos dentro del cuerpo del insecto para evitar la colonización de otras bacterias contaminantes. Estas bacterias y sus subproductos le ayudan al nematodo para su desarrollo, poniendo al nematodo como vector que este ayuda que la bacteria llegue al insecto (Woodring y Kaya, 1988).

Sintomatología

Los cadáveres del huésped de *Heterorhabditis* spp., se tornan de un color rojo, rojizo, rojo ladrillo, púrpura, naranja oscuro, café, café oscuro o rara vez de color verde, otra característica para identificar la sintomatología que presenta *Heterorhabditis* spp., es la presencia de luminiscencia en la oscuridad (Woodring y Kaya, 1988).

Especies de *Heterorhabditis* y bacteria mutualista

Boemare *et al.*, (1993) mencionaron que el género está compuesto por ocho especies, todos ellos asociados mutualistamente a la bacteria *Photorhabdus luminescens*.

Cuadro 2. Especies de *Heterorhabditis* y bacteria mutualista

Espece de <i>Heterorhabditis</i>	Bacteria asociada
<i>Heterorhabditis argentinensis</i>	<i>Photorhabdus luminescens</i>
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i> (= <i>Heliolithidis</i>)	<i>Photorhabdus luminescens</i>
<i>Heterorhabditis brevicaudis</i>	<i>Photorhabdus luminescens</i>
<i>Heterorhabditis hawaiiensis</i>	<i>Photorhabdus luminescens</i>
<i>Heterorhabditis indicus</i>	<i>Photorhabdus luminescens</i>
<i>Heterorhabditis marelatus</i>	<i>Photorhabdus luminescens</i>
<i>Heterorhabditis megidis</i>	<i>Photorhabdus luminescens</i>
<i>Heterorhabditis zelandica</i>	<i>Photorhabdus luminescens</i>

Características del género *Steinernema*

Según Chitwood (1937) clasificó a *Steinernema* como género, perteneciendo al orden Rhabditida, Familia Steinernematidae. Nguyen y Smart (1996) reportaron que los Steinernematidos son patógenos obligados de insectos que logran matar a su huésped cuando penetran y llegan al hemocele del insecto. Se producen dos o tres generaciones dentro del cadáver, *Steinernema* spp., presenta machos y

hembras (no hermafroditas) la copula se debe generar entre hembra y macho para la reproducción.

Morfología

Una de las características con la que se puede distinguir a los juveniles inefectivo de los *Steinernema* spp., es la presencia de un poro excretor localizado en posición anterior al anillo nervioso. Los machos no poseen Bursa y tienen de 21 a 23 papilas genitales. El estoma es corto y ancho, el esófago compuesto de un cuerpo cilíndrico, espículas apareadas y separadas y gubernáculos presentes. También muestran una asociación mutualista con bacterias del género *Xenorhabdus* spp., las cuales se encuentran localizadas en su intestino del nematodo (George y Poinar, 1979).



Figura 2. B), Juvenil infectivo del tercer estadio de *Steinernema carpocapsea* A), muestra la cutícula del segundo estadio (arriba) (INIAP, 2014).

Ciclo de Vida y Patogenicidad

La infección por Steinernematidos es dada por el J3, está adaptado morfológicamente y fisiológicamente para establecerse en el medio ambiente sin poder alimentarse por un tiempo largo. *Xenorhabdus* spp., es la bacteria simbiótica relacionada con *Steinernema* spp., que le brinda beneficios al nematodo como matar en menor tiempo al huésped, importancia nutricional y un rango alto de hospederos (Poinar, 1979).

De igual forma que los Heterorhabditidos están adaptados para buscar a su huésped y sobrevivir en el suelo, según reportes *S. carpocapsae*, *S. glaseri* tiene la facilidad de buscar a sus huéspedes cerca o sobre la superficie del suelo (Alatorre y Kaya, 1990).

Cada estado subsiguiente se alimenta y muda hasta el próximo estado, de J2 a J3 y luego a J4 y finalmente al estado adulto, tienen la tendencia de buscar a su huésped por los estímulos físicos y químicos que este produce, las vías más comunes de entrada al huésped es por la boca, ano y espiráculos. La reproducción de los Steinernematidos consta de alrededor de 10 días, periodo en que se completa el ciclo de vida. Y finalmente el J3 abandona el cadáver en busca de nuevos huéspedes y de igual manera que los *Heterorhabditis* spp., pueden vivir por varias semanas o meses (Womersley y Gaugler, 1990).

Como actúan dentro del insecto

Se sabe que el infectivo juvenil transporta la bacteria *Xenorhabdus* spp., En la porción ventricular de su intestino. Una vez que el nematodo penetra y alcanza el hemocele, la bacteria es liberada dentro de la hemolinfa donde se propaga, causando la muerte del hospedante por septicemia dentro de 48 horas. Principalmente al multiplicarse la bacteria produce enzimas proteolíticas (destructoras de proteína). El nematodo se alimenta de la bacteria y tejidos del hospedante, estas bacterias proveen los componentes necesarios para su desarrollo, principalmente en su sistema reproductor. La bacteria depende del

nematodo para poder penetrar hasta la hemolinfa y parasitar al huésped. Estando el nematodo adentro del insecto huésped este inhibe sus defensas antibacterianas. La bacteria genera toxinas que matan al huésped y produce antibióticos para evitar la proliferación de otras bacterias contaminantes (Akhurst, 1989).

Sintomatología

El cadáver del insecto huésped infectado por *Steinernema* spp., cambia de color crema, naranja, amarillo, amarillo oscuro rara vez negro y este no presenta luminiscencia en la oscuridad característica para identificar por cual familia fue infectado el hospedante. (Woodring y Kaya, 1988).

Especies de *Steinernema* y bacteria asociada

Guzmán y Alatorre (1999). Mencionaron que existen 16 especies descritas del genero *Steinernema* spp., encontradas infectando de forma natural a insectos con una relación mutualista con la bacteria del género *Xenorhabdus* spp.

Cuadro 3. Especies de *Steinernema* y bacteria asociada

Especies de <i>Steinernema</i>	Bacteria asociada
<i>Steinernema affinis</i>	<i>Xenorhabdus bovienii</i>

<i>Steinernema anomali</i>	<i>Xenorhabdus spp.</i>
<i>Steinernema bicornutum</i>	No identificada
<i>Steinernema carpocapsae</i>	<i>Xenorhabdus nematophilus</i>
<i>Steinernema Filipjev</i>	<i>Xenorhabdus bovienii</i>
<i>Steinernema glaseri</i>	<i>Xenorhabdus poinarii</i>
<i>Steinernema intermedia</i>	<i>Xenorhabdus bovienii</i>
<i>Steinernema kraussei</i>	No identificada
<i>Steinernema kushidai</i>	No identificada
<i>Steinernema longicaudatum</i>	No identificada
<i>Steinernema neocurtilis</i>	No identificada
<i>Steinernema puertoricensis</i>	No identificada
<i>Steinernema rara</i>	No identificada
<i>Steinernema riobravisi</i>	No identificada
<i>Steinernema ritteri</i>	No identificada
<i>Steinernema scapterisci</i>	No identificada

Métodos de producción de nematodos entomopatógenos

La producción masiva de agentes de control microbiano para el uso de bioplaguicidas en el mercado está denominado por antagonistas, artrópodos, nematodos y microorganismos (bacterias y hongos). Los nematodos entomopatógenos tiene la característica de ser cultivados de manera fácil *in vitro* o *in vivo*. El insecto utilizado como reactor biológico es la polilla mayor de las colmenas *Galleria mellonella*. Este se utiliza para una producción en menor escala de manera *in vivo*, inoculando al nematodo en larvas de tercer estadio de *G. mellonella*, teniendo una producción de 200,000.00 a 400,000.00 juveniles infectivos por larva, con emergencia de juveniles infectivos de tercer estadio a los 10 días de la inoculación. Para la producción de manera *in vitro* en escala de mayor producción, existe el método en medio solido dimensional o método de fermentación liquida y método solido tridimensional. Donde usan espuma de poliuretano poliéster como medio nutritivo, inoculando primero la bacteria simbiote y después los nematodos,

produciendo un aproximado de 7,500 a 8,000 millones de juveniles infectivos por litro con estos métodos (Bedding, 1984; Saenz, 2000; Shapiro *et al.*, 2003).

Producción de nematodos entomopatógenos usando a *Tenebrio molitor* como reactor biológico

El insecto que obtiene el segundo lugar como reactor biológico para la producción de nematodos entomopatógenos (NEPs) es *Tenebrio molitor*, su cría es sustancialmente más barata en laboratorio, la obtención del mismo es más sencilla, ya que es criado en tiendas de mascotas para la alimentación de otros seres vivos. Por los grandes beneficios que se obtiene al consumir este insecto, son criados por más compañías que cualquier otro insecto. La susceptibilidad que tiene con las especies de NEPs es alta.

Para proceder la producción de nematodos principalmente se tiene que infectar a las larvas de *T. molitor*. Por ejemplo, las tasas de aproximadamente 100-600 juveniles infectivos por insecto-larva suelen ser suficientes (dependiendo de las especies de nematodos y el método de inoculación) para infectar a *T. molitor*. Infectada la larva es colocada en trampas White, consiste en un plato o bandeja (caja Petri) en la que se colocan los cadáveres, el plato está rodeado de agua, que está contenida por un papel whatman. Todos los laboratorios de NEPs usan ese método aunque con algunas modificaciones, especialmente para producción, experimentos y para mantenimiento de colecciones de nematodos. Otro método utilizado son las cámaras húmedas. Con este insecto como reactor biológico se obtiene un aproximado de 80,000.00 a 100,000.00 juveniles infectivos por larva, con un tiempo de emergencia de los cadáveres de las larvas a los 11 días de la inoculación (Kaya y Stock, 1997). El rendimiento de nematodos también varía proporcionalmente al tamaño del hospedador, la cantidad de juveniles infectivos inoculados, la temperatura, la humedad y la aireación manejada en el proceso. Al

menos se tienen 13 especies de NEPs activas como bioplaguicidas comercialmente (Lacey, 2017).

Virulencia

Se comprende como la capacidad de generar enfermedad en términos de grado o velocidad de daño, los NEPs poseen esa capacidad hacia un hospedante insecto. La alta virulencia es una característica esencial que debe contener todo agente microbiano que se quiera utilizar en estrategias de control a corto plazo, lo cual les permite tener:

- a) Capacidad para matar más rápidamente
- b) Reducir los daños al cultivo, ya que tendría la capacidad de reducir la población del insecto por debajo del umbral económico o de daño (Vazquez, 2006).

Importancia de las plagas del suelo

El suelo no sólo constituye la capa superficial de la corteza terrestre. Es el medio natural en donde se da el desarrollo de la vida vegetal, el suelo es el que alimenta los cultivos y al mismo tiempo constituye la base de la rentabilidad de la agricultura. El estudio de los insectos subterráneos es importante a nivel mundial debido a los daños económicos que causan a numerosas especies vegetales. En México existen muchas especies de insectos que viven en el suelo, particularmente de los órdenes Coleóptera y Lepidóptera, que causan perjuicios considerables a los cultivos, el daño que las larvas ocasionan a la planta es irreversible por alimentarse de las partes subterráneas y la base del tallo. Las larvas de las plagas del suelo raspan, cortan o atraviesan los tallos a altura del suelo, debilitando la planta por otra parte hay larvas que atacan los tubérculos en el suelo, Permitiendo la entrada de

patógenos u otros insectos. Las pérdidas en rendimiento y calidad varían de acuerdo con la plaga, cultivo, manejo agronómico y la región (FAO, 2004).

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del área del experimento

El presente trabajo se desarrolló en la cámara bioclimática siete, del Departamento de Parasitología agrícola, localizado en el campus principal de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Reactivación de cepas entomopatógenas y origen

Las cepas utilizadas fueron donadas de la colección del banco de microorganismos entomopatógenos de la cámara bioclimática siete (UAAAN), (cepas M5, M6, M18, MZ6, MZ9 y B7); originalmente fueron colectados de las áreas agrícolas experimentales de "El Bajío" en la Universidad. Previamente, las cepas utilizadas fueron identificadas morfológicamente por el M.C. Diego Treviño Cueto. Se realizó una infección previa a los bioensayos de patogenicidad, con la finalidad de contar con juveniles infectivos (JI) de tercer estadio. Se seleccionaron larvas de *T. molitor* de último estadio, de la colonia ya establecida en la misma cámara, mantenida con una dieta artificial de hojuelas de avena y harina. Se prepararon 18 cajas Petri en total, con cinco larvas y tres repeticiones por cepa. Colocando un círculo de papel estraza humedecido con agua purificada en cada caja Petri. Se agregaron 500 μ l de solución agua-nematodo de cada cepa a sus tres repeticiones. Se rotularon las cepas e incubando a temperatura ambiente y así confirmar los postulados de Koch y la patogenicidad de las cepas. Mostrando las larvas sintomatología de infección por los NEPs; posteriormente se introdujeron en cámaras húmedas con la finalidad que los JI eclosionen del huésped.

Identificación de género de nematodos

Con la finalidad de corroborar el género para cada cepa utilizada. Se identificó con parámetros ya establecidos de sintomatología que muestran los cadáveres de sus huéspedes de *Steinernema* spp., y *Heterorhabditis* spp., Cada larva fue observada detalladamente de forma visual, verificando que las características que definen a cada género de NEPs estuvieran presentes.

Bioensayo de patogenicidad y virulencia *in vitro* contra *Tenebrio molitor*

Se realizó un conteo de nematodos para determinar las concentraciones. Aplicando a cada cepa la dosis de JI requerida. De la solución madre se tomaron tres muestras de 5 µl, contabilizando visualmente el promedio de JI por muestra en el microscopio compuesto. Posteriormente se ajustó para determinar la cantidad de JI por mililitro y ajustar la dosis requerida en concentraciones/ml (Shapiro *et al.*, 2016).

En la realización del bioensayo se utilizaron seis aislamientos; *Steinernema* spp., (cepas M6, M5, B7) y *Heterorhabditis* spp., (cepas M18, MZ9, MZ6). Se utilizaron larvas de último instar. La unidad experimental estuvo constituida por cajas Petri de 100 x 15 mm. Colocando un círculo de papel estroza húmedo por caja Petri y un grupo de 10 larvas de *T. molitor*, aplicando dosis de 10, 25, 50, 100, 200 JI/ larva de *Tenebrio*. Se estableció un total de 30 tratamientos (seis cepas con cinco dosis/cepa) y 10 repeticiones con un testigo de 10 larvas tratadas con agua purificada sin nematodos. Se estableció un diseño completamente al azar. Una vez efectuada la inoculación equitativamente con la solución agua-nematodo (concentración), se registró la mortalidad de larvas cada 24 horas por 72 horas. Verificando que las larvas muertas no presentaran movilidad (Beavers y Calkins, 1984; Finney y Bennet, 1984).

Análisis de datos

Con los datos obtenidos en el bioensayo se realizó corrección de mortalidad con la fórmula propuesta por Abbott (1925); posteriormente se determinó la curva de respuesta dosis-mortalidad mediante un análisis Probit (Finney, 1971). Para obtener la dosis letal media (DL_{50}), se utilizó el programa estadístico computacional SAS (1988). Se realizó un análisis de varianza para las mortalidades por tiempos y dosis y se aplicó la prueba de Tukey para la separación de las medias en el programa R studio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todas las cepas reactivadas fueron capaces de multiplicarse, reproducirse y al mismo tiempo los JI, pudieron desarrollarse de manera aparentemente normal sobre las larvas de *T. molitor*. La reactivación de cepas (M5, M6, M18, MZ6, MZ9 y B7) se manifestó de manera adecuada confirmando en su totalidad la patogenicidad y los postulados de Koch. Lo cual coincide con Glaser que investigó la patogenicidad de nematodos entomopatógenos y los clasificó como agentes de control biológico contra insectos plagas (Glaser, 1932). Desde la inoculación de las cepas en las larvas hasta obtener JI transcurrió un periodo aproximado de 17 días.

Sintomatología observada en la reactivación de cepas corroborando la identificación

En el cuadro 4 se observa la sintomatología que presentaron las larvas infectadas con cada cepa, determinando la sintomatología ya establecida para cada género de NEPs, confirmando la cepa con el género utilizado en el experimento. De acuerdo con Woodring y Kaya el color obtenido para el género *Steinernema* spp., es amarillento, café o negruzco; se presenta ausencia de luminiscencia de la bacteria *Xenorhabdus* spp. Por otra parte, *Heterorhabditis* spp., genera un color rojizo-café oscuro, o color vino, causado por la bacteria *Photorhabdus* spp. Sin embargo en nuestro trabajo no se observó la bioluminiscencia reportada para este género (Woodring y Kaya, 1988).

Cuadro 4. Sintomatología observados en *Tenebrio molitor* para confirmar el género de la cepa evaluada

Cepa	Género	Sintomatología observada	Origen	Foto
M6	<i>Steinernema</i> spp.	Color amarillo-amarillo oscuro presencia de sintomatología a las 48 horas	Coahuila	
M5	<i>Steinernema</i> spp.	Color amarillo – crema presencia de sintomatología a las 48 horas	Coahuila	
B7	<i>Steinernema</i> spp.	Color negro sintomatología a las 48 horas	Coahuila	
M18	<i>Heterorhabditis</i> spp.	Color rojizo - café oscuro sintomatología a las 72 horas	Coahuila	
MZ9	<i>Heterorhabditis</i> spp.	Color rojizo - café oscuro sintomatología a las 72 horas	Coahuila	
MZ6	<i>Heterorhabditis</i> spp.	Color rojizo - café oscuro presencia de sintomatología a las 72 horas	Coahuila	

Bioensayo de patogenicidad y virulencia

Todas las cepas evaluadas presentaron mortalidad en un rango de 15.16% a 100% en tiempos de 24 a 72 horas. La cepa que obtuvo la mayor virulencia fue M5 *Steinerema* spp. Ehlers (2001) menciona que la actividad larvicida que generan los NEPs, se debe al mutualismo entre las bacterias que poseen las familias consideradas NEPs. Debido a la bacteria (*Xenorhabdus* spp.) que posee el género *Steinernema* spp., aparentemente en este caso actuó con mayor virulencia en las larvas de *T. molitor* por lo que se considera la cepa M5 (*Steinernema* spp.) más virulenta, patogénica y con mayor efecto larvicida.

Dosis letal media de las cepas evaluadas contra larvas de *Tenebrio molitor*

Es importante mencionar que las cepas evaluadas mostraron rápidamente altos niveles de mortalidad (a veces a las 24 horas) en las condiciones utilizadas y a las dosis aplicadas. Por esta razón, el análisis Probit no determinó los límites fiduciales (intervalos de confianza). Lo cual se debió posiblemente a la poca diferencia de mortalidad entre las dosis y los tiempos de incubación, y a la competencia intra-específica; entre mayor presencia de individuos la competencia es alta, posiblemente esto genera una invasión menor o menos acentuada por cual dosis altas presentaron resultados similares de mortalidad respecto a las dosis más bajas. Alatorre y Kaya (1990) mencionaron que la competencia intra-específica se da entre nematodos entomopatógenos, como en cualquier población de seres vivos. Por lo tanto, es factible que la infección (mortalidad) no es creciente al aumentar la dosis, sino que se mantiene estable o al contrario puede incluso disminuir, como se observó en algunos tratamientos del trabajo presente. Posiblemente una relación más clara entre dosis y mortalidad se hubiera visto si se hubieran utilizado dosis aún más bajas (menos de cinco JI/larva).

Los resultados obtenidos del análisis Probit se muestran en los apéndices del 1 al 6, cabe mencionar de nuevo que no son informativos porque la mortalidad no aumenta perceptiblemente al incrementar las dosis. En el cuadro 5 se pueden observar las dosis letales para un tiempo de 48 h. La menor dosis letal media fue en la cepa MZ9 (*Heterorhabditis* spp.) con DL₅₀ de 4 JI/larva de *T. molitor*. Doucet *et al.* (1992) reportan para la especie *H. bacteriophora* una dosis letal media (DL₅₀) de 4 a 9 JI/larva de *G. mellonella*. Coincidiendo con la cepa MZ9 *Heterorhabditis* spp.

La cepa que obtuvo la dosis letal media con numero alto de JI fue la cepa MZ6 (*Heterorhabditis* spp.) con DL₅₀ de 600,350 JI/larva de *T. molitor*. Alvarado (2012) determino para el género *Steinernema* spp., DL₅₀ de 7,174 JI/larva de *G. mellonella*. Corroborando con los resultados obtenidos en el cuadro 5 y en comparación con lo reportado por Alvarado se determina que no existe tendencia a mayor mortalidad en las dosis observadas, entre nuestros aislamientos de los dos géneros. Aun perteneciendo ambos géneros (*Steinernema* spp., y *Heterorhabditis* spp.) a familias de NEPs.

Cuadro 5. Efectividad biológica en dosis letal media sobre *Tenebrio molitor* por cepa

Cepa	Genero	\bar{X} h	DL ₅₀ JI/L	pendiente	Pr >
M6	<i>Steinernema</i> spp.	48	797.10	0.3214	0.0938
B7	<i>Steinernema</i> spp.	48	227.45	0.9256	0.0079
M5	<i>Steinernema</i> spp.	48	52.27	0.5818	0.0781
MZ6	<i>Heterorhabditis</i> spp.	48	600353	0.0446	0.7194
MZ9	<i>Heterorhabditis</i> spp.	48	3.75	0.2887	0.0496
M18	<i>Heterorhabditis</i> spp.	48	114.76	0.0853	0.4899

Pr >: probabilidad al 95% Tukey, \bar{X} : media de las horas utilizadas (24, 48 y 72 h)

Mortalidad sobre *Tenebrio molitor* causada por las cepas de nematodos entomopatógenos

Comparando las cinco cepas evaluadas en base a los resultados de porcentaje de mortalidad, la cepa que presentó mejor actividad larvicida fue M5 *Steinernema* spp.,

con 100%, cepa M6 *Steinernema* spp., con 97%, cepa MZ9 *Heterorhabditis* spp., con 92.52%, cepa M18 *Heterorhabditis* spp., con 80.61%, cepa B7 *Steinernema* spp., con 71.72% y cepa MZ6 *Heterorhabditis* spp., con 62.23% de mortalidad. Y con mortalidad más baja fue la cepa MZ9 género *Heterorhabditis* spp., con 15.16% en dosis de 50 JI/larva en tiempo de 24 h.

En el cuadro 6 se observa que hubo diferencia significativa entre dosis y hora de la mortalidad de la cepa M5 *Steinernema* spp., Mostrando tres niveles de significancia y desviación estándar. Se observa un 100% de mortalidad en larvas de *T. molitor* a partir de las dosis 25 a 200 JI/larva en 72 h. Demostrando que en la dosis 25 JI/larva es eficiente al igual que la dosis 200 JI/larva. Cabe detallar a las 48 h con la dosis 200 JI/larva genera el 98% de mortalidad. Por lo que no existe diferencia significativa en el uso de las diferentes dosis de JI/larva con respecto al tiempo.

Cuadro 6. Mortalidad de la cepa M5 *Steinernema* spp., sobre *Tenebrio molitor*

Mortalidad de la cepa M5 <i>Steinernema</i> spp.			
Dosis JI/larva	24 h (media +- SD)	48 h (media +- SD)	72 h (media +- SD)
10	30.75 +- 19.04 c	66.55 +- 20.41 b	83.94 +- 13.15 b
25	56.80 +- 17.97 a	80.33 +- 16.86 ab	100 +- 0.00 a
50	40.44 +- 9.41 bc	92.44 +- 10.47 a	100 +- 0.00 a
100	45.49 +- 17.42 bc	84.66 +- 12.76 a	100 +- 0.00 a
200	72.16 +- 17.16 c	98.00 +- 4.21 a	100 +- 0.00 a

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, SD: desviación estándar.

La figura 3 muestra los porcentajes de mortalidad en diferentes dosis en tres tiempos causados por la cepa M5 *Steinernema* spp., El cual redujo poblaciones del 100% en larvas de *T. molitor* en dosis de 25, 50, 100 y 200 JI/larva en 72 h. Concertando con lo reportado por Doucet *et al.* (1992) que mencionó que para especie *S. carpocapsae* causó el 100% de mortalidad en larvas de *G. mellonella* en 72 h.

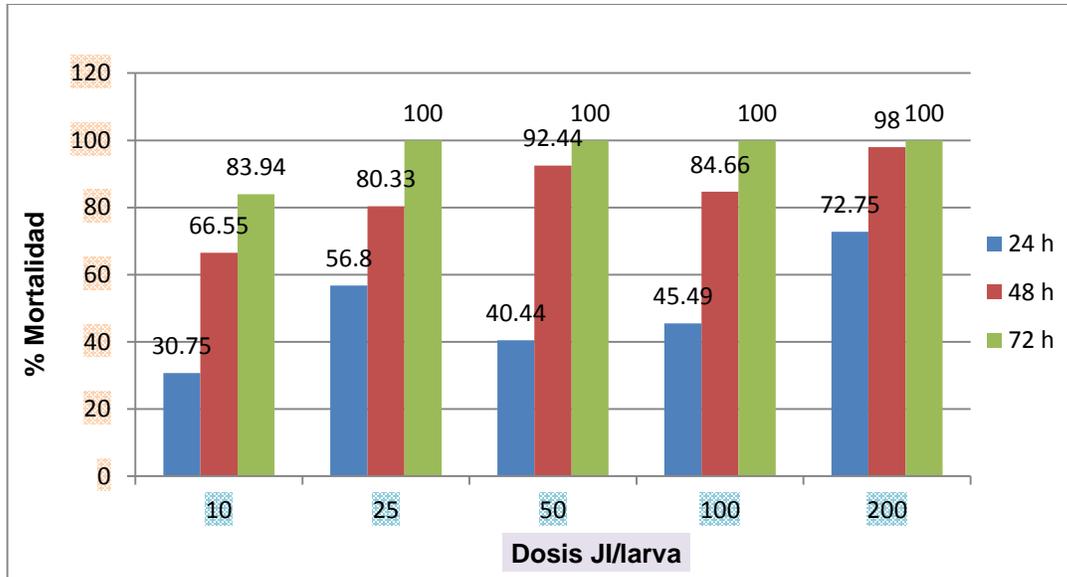


Figura 3. Porcentaje de mortalidad cepa M5 *Steinernema* spp.

En el cuadro 7 se presenta los niveles de significancia, desviación estándar de la cepa M6 *Steinernema* spp. La cual mostró diferencia significativa entre dosis por hora con dos niveles de significancia. Resaltando en el tiempo de 24 h no hubo diferencia significativa en ninguna dosis.

Cuadro 7. Mortalidad de la cepa M6 *Steinernema* spp., sobre *Tenebrio molitor*

Mortalidad de la cepa M6 <i>Steinernema</i> spp.			
Dosis JI/larva	24 h (media +- SD)	48 h (media+- SD)	72 h (media +- SD)
10	24.02 +-14.25 a	58.83 +- 17.83 b	77.09 +- 19.11 ab
25	35.36 + 16.20 a	76.14 +- 13.61 ab	87.19 +- 9.18 ab
50	31.33 +- 18.15 a	79.41 +- 14.94 ab	95.55 +- 7.76a

100	47.52 +- 15.12 a	89.66 +- 10.79 a	97.00 +- 4.83a
200	36.19 +- 27.31 a	59.97 +- 38.87 b	65.55 +- 37.30b

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, SD: desviación estándar.

En la figura 4 se muestran los porcentajes de mortalidad en larvas de *T. molitor* obtenidos por dosis en tiempos de 24, 48 y 72 h. Para la cepa M6 *Steinernema* spp., en comparación con la cepa M5 *Steinernema* spp., la mayor mortalidad en el tiempo de 72 h no hubo mucha diferencia. Generando una mortalidad máxima de 97% en 72 h con dosis de 100 JI/larva siendo la dosis que actuó mejor, una mortalidad mínima de 24.02% en 24 h con dosis de 10 JI/larva. Ruiz *et al.* (2017) evaluaron la mortalidad de la cepa NJ-43 *S. glasari* en larvas de *T. molitor*. Obteniendo una mortalidad del 95% en 96 h, con dosis de 300 JI/larva. Coincidiendo con la cepa M6 *Steinernema* spp., en rangos de mayor mortalidad.

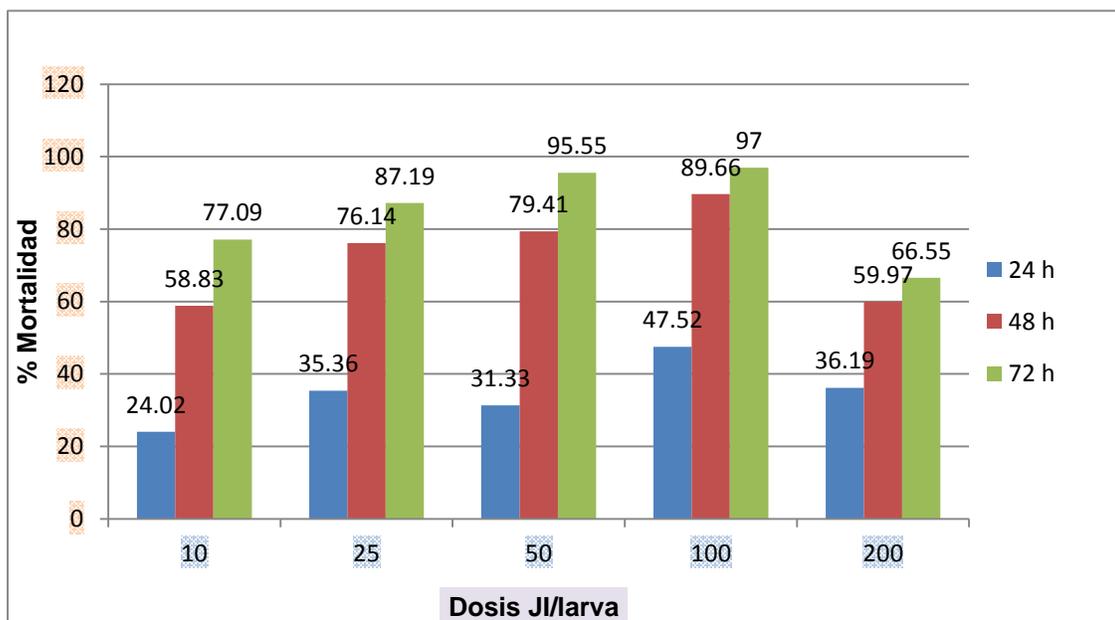


Figura 4. Porcentaje de mortalidad cepa M6 *Steinernema* spp.

El cuadro 8 expone la mortalidad con niveles de significancia por dosis en tres tiempos de la cepa B7 *Steinernema* spp., el cual no hubo diferencia significativa entre las dosis aplicadas en los tiempos 24, 48 y 72 h. Por lo tanto las cinco dosis pueden causar el mismo daño en los tres tiempos estadísticamente.

Cuadro 8. Mortalidad de la cepa B7 *Steinernema* spp., sobre *Tenebrio molitor*

Mortalidad de la cepa B7 <i>Steinernema</i> spp.			
Dosis JI/larva	24 h (media +- SD)	48 h (media +- SD)	72 h (media +- SD)
10	43.91 +- 12.48 a	66.27 +- 15.52 a	71.72 +- 13.85 a
25	48.00 +- 14.05 a	65.16 +- 19.33 a	69.38 +- 18.25 a
50	53.00 +- 18.16 a	60.55 +- 23.23 a	71.13 +- 22.98 a
100	40.19 +- 17.29 a	57.33 +- 24.93 a	60.55 +- 22.78 a
200	52.66 +- 25.77 a	67.33 +- 29.72 a	69.05 +- 30.52 a

Letras iguales indican que no hubo diferencia estadísticamente significativa, SD: desviación estándar.

La Figura 5 interpreta el porcentaje de mortalidad en larvas de *T. molitor* de la cepa B7 *Steinernema* spp., en intervalos de 40.19 a 71.72% de mortalidad en las cinco dosis en los tres tiempos. Apreciando en la dosis 10 JI/larva la mortalidad sobresaliente de 71.72% en 72 h, contrario a la dosis 100 JI/larva con porcentaje de 40.19% en 24 h. Cagnolo y González (2017) estimaron el comportamiento de localización y elección de hospederos de la especie *S. rarum* cepa OLI en larvas de *G. mellonella*. Demostrando mortalidad del 85% con dosis de 150 JI/larva en 48 h. Por lo que se demuestra que hay variabilidad entre el control que ejercieron las cepas. La cual puede ser por diferentes características de adaptabilidad, factores edáficos, temperatura y la región geográfica de la cual se aislaron las cepas (Treviño, 2015).

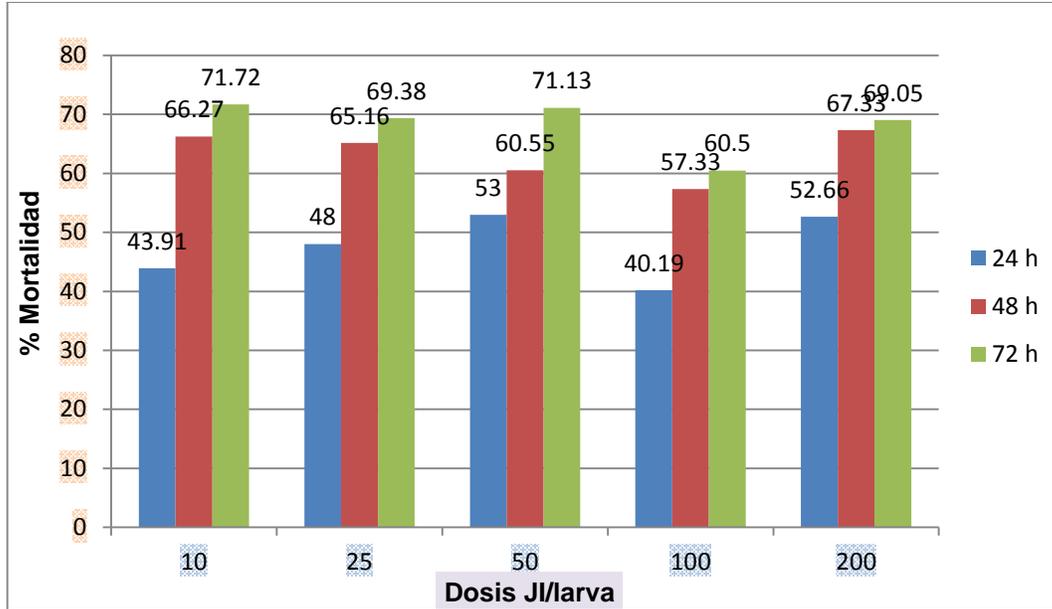


Figura 5. Porcentaje de mortalidad cepa B7 *Steinernema* spp.

Se refleja en el cuadro 9 para la cepa MZ9 *Heterorhabditis* spp., que hay diferencia significativas entre dosis y horas. Mostrando dos niveles de significancia y la desviación estándar. Resaltando en la dosis 50, 200 JI/larva en 72 h en comparación con el género *Steinernema* spp., cepa M6 en las mismas dosis y hora no hubo diferencia significativa.

Cuadro 9. Mortalidad de la cepa MZ9 *Heterorhabditis* spp., sobre *Tenebrio molitor*

Mortalidad de la cepa MZ9 <i>Heterorhabditis</i> spp.			
Dosis JI/larva	24 h (media +- SD)	48 h (media +- SD)	72 h (media +- SD)
10	45.16 +- 17.95 a	58.03 +- 19.28 a	64.16 +- 14.79 b
25	36.36 +- 19.11 ab	50.02 +- 13.44 b	69.94 +- 15.84 b
50	15.16 +- 21.32 b	57.80 +- 18.65 b	73.6 +- 15.53 b
100	28.52 +- 22.01 ab	82.72 +- 13.87 a	92.52 +- 7.03 a
200	21.91 +- 15.75 ab	85.94 +- 7.89 a	92.41 +- 7.44 a

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, SD: desviación estándar

En la figura 6 se muestra la mortalidad producida en larvas de *T. molitor* por la cepa MZ9 *Heterorhabditis* spp., en tiempos de 24, 48 y 72 h. Notando que estableció mortalidad del 92.41% en dosis de 200 JI/larva y 92.52% en dosis de 100 JI/larva en 72 h, mortalidad de 15.16% en 24 h con dosis de 50 JI/larva. En contrastes con lo reportado por Mracek *et al.* (1999) la especie *S. kraussei* logró matar el 100% en larvas de *G. mellonella* en 265 h. coincidiendo en el porcentaje de mortalidad pero la cepa MZ9 *Heterorhabditis* spp., fue más virulenta con respecto al tiempo.

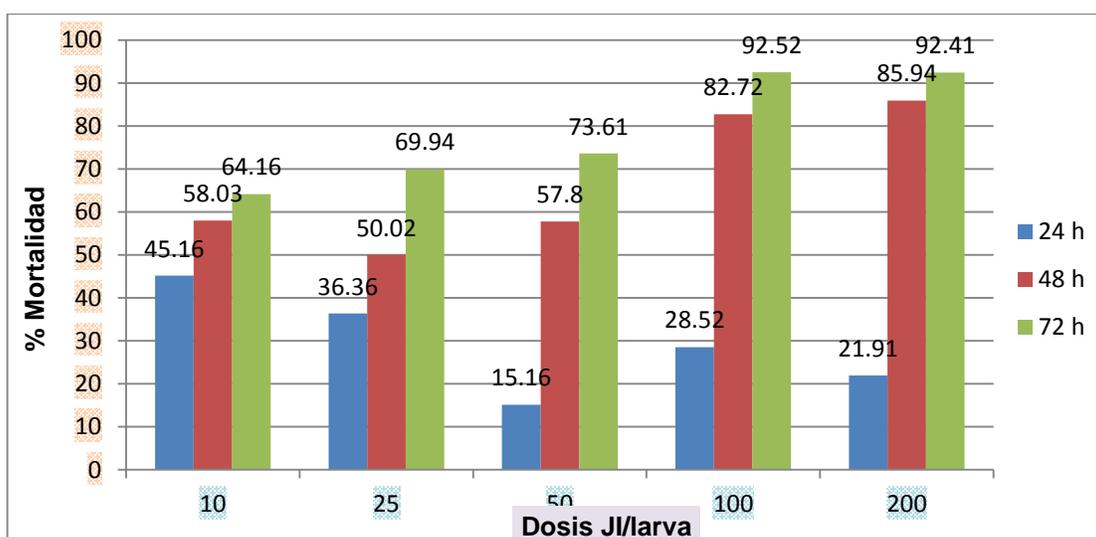


Figura 6. Porcentaje de mortalidad cepa MZ9 *Heterorhabditis* spp.

En el cuadro 10 se observa la desviación estándar y mortalidad de la cepa M18 *Heterorhabditis* spp., con diferencia significativa entre dosis y tiempo. Con tres niveles de significancia, observando una distribución normal solo en el tiempo 48 h al incrementar la dosis aumenta la mortalidad.

Cuadro 10. Mortalidad de la cepa M18 *Heterorhabditis* spp., sobre *Tenebrio molitor*

Mortalidad de la cepa M18 <i>Heterorhabditis</i> spp.			
Dosis JI/larva	24 h (media +- SD)	48 h (media +- SD)	72 h (media +- SD)
10	22.88 +- 12.39 b	24.88 +- 15.00 c	32.47 +- 15.02 a
25	19.77 +- 18.46 b	25.25 +- 15.66 bc	30.36 +- 15.78 c
50	39.49 +- 21.38 b	44.94 +- 21.03 bc	50.72 +- 21.80 bc
100	33.36 +- 24.71 b	48.50 +- 24.06 b	59.19 +- 21.41 bc

200	70.77 +- 13.66 a	75.00 +- 13.88 a	80.61 +- 13.25 a
-----	------------------	------------------	------------------

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, SD: desviación estándar

La figura 7 representa la mortalidad de *T. molitor* en dosis por tiempo para la cepa M18 *Heterorhabditis* spp., Alcanzando una mortalidad de 80.61% con dosis de 200 JI/larva en 72 h y una mortalidad de 19.77% con dosis de 25 JI/larva en 24 h. James *et al.* (2017) reportan una mortalidad para la especie *H. noenieputensis* del 93% en larvas de *Ceratitis capitata* con dosis de 200 JI/larva en 96 h. Teniendo mayor mortalidad *H. noenieputensis* por factores antes mencionados. En comparación con las otras cinco cepas esta muestra una tendencia normal conforme a los tiempos por dosis.

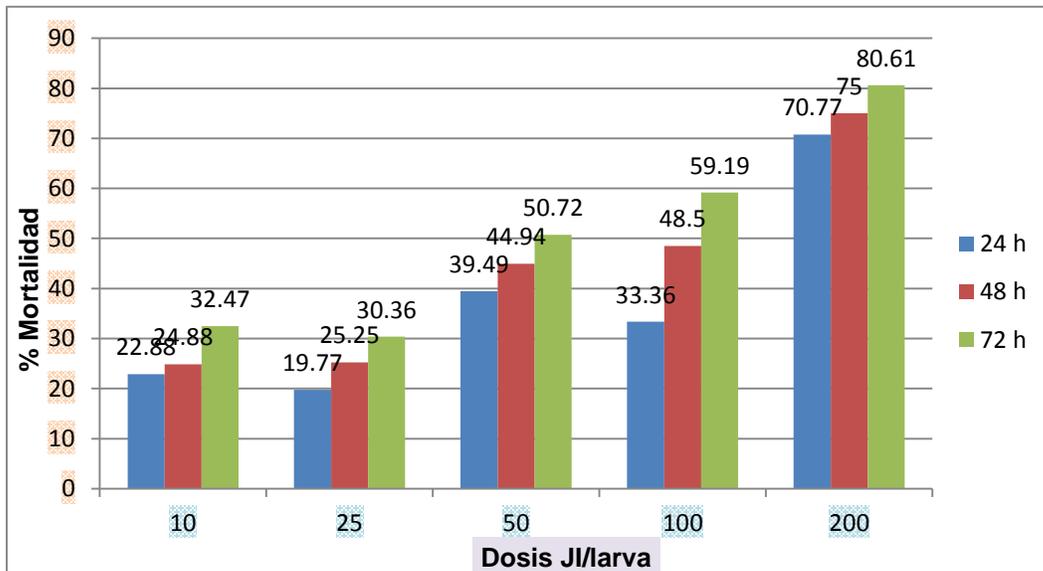


Figura 7. Porcentaje de mortalidad cepa M18 *Heterorhabditis* spp.

En el cuadro 11 se muestra la mortalidad en base a los niveles de significancia y la desviación estándar. La cepa MZ6 *Heterorhabditis* spp., no generó diferencia significativa entre dosis por tiempo, asíéndola estadísticamente igual de virulenta que la cepa B7 *Steinernema* spp., que no presentó diferencia significativa.

Cuadro 11. Mortalidad de la cepa MZ6 *Heterorhabditis* spp., sobre *Tenebrio molitor*

Mortalidad de la cepa MZ6 <i>Heterorhabditis</i> spp.			
Dosis JI/larva	24 h (media +- SD)	48 h (media +- SD)	72 h (media +- SD)
10	40.16 +- 19.00 a	51.61 +- 30.30 a	56.83 +- 17.95 a
25	44.33 +- 19.52 a	50.66 +- 24.70 a	55.02 +- 19.11 a
50	42.05 +- 21.56 a	62.33 +- 26.18 a	70.44 +- 21.23 a
100	44.55 +- 18.60 a	56.11 +- 24.89 a	72.02 +- 22.01 a
200	42.63 +- 14.82 a	53.08 +- 23.09 a	62.69 +- 15.75 a

Letras iguales indican que no hubo diferencia estadísticamente significativa, SD: desviación estándar.

La figura 8 enseña el porcentaje de mortalidad de *T. molitor* en los tiempos de 24, 48 y 72 h. De la cepa MZ6 *Heterorahbditis* spp., con mortalidad mayor de 72.02% con dosis de 100 JI/larva en 72 h y menor porcentaje de 40.16% con dosis de 10 JI/larva en 24 h. Monchan *et al.* (2011) midieron la infección de *H. indica* cepa T2 con una temperatura de 25 °C en larvas de *T. molitor* de ultimo instar, determinando mortalidad de 43% con dosis de 50 JI/larva en 72 h. Con lo mencionado la cepa MZ6 *Heterorhabditis* spp., genera mejor actividad larvicida en la dosis de 100 JI/larva.

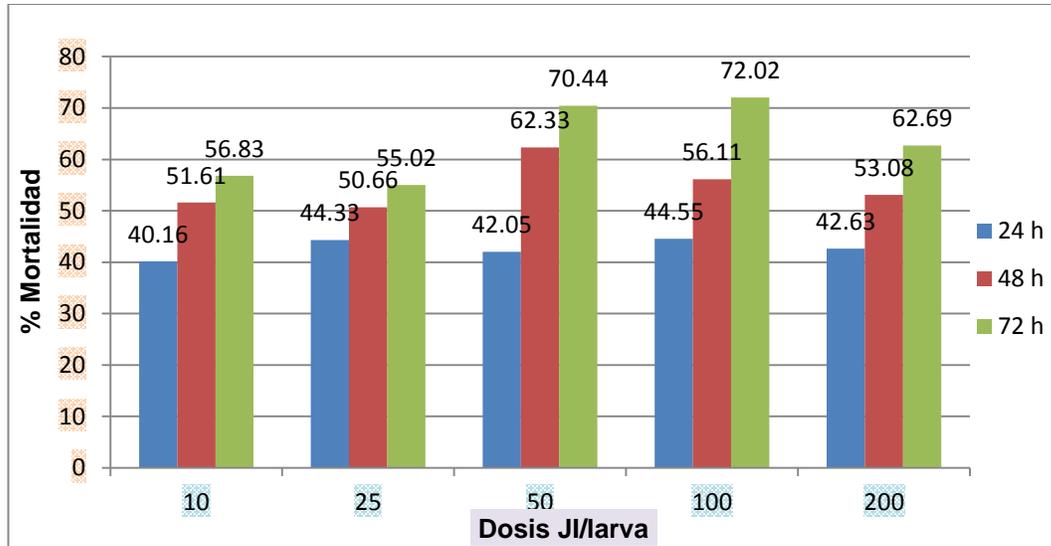


Figura 8. Porcentaje de mortalidad cepa MZ9 *Heterorhabditis* spp.

Comparación de medias de mortalidad sobre *Tenebrio molitor*

El cuadro 12 se muestra la comparación de medias de mortalidad en el tiempo de 24 h para todas las cepas evaluadas. Destacando la cepa M5 *Steinernema* spp., con 72.16% en dosis de 200 JI/larva. Generando la menor mortalidad para la cepa MZ9 *Heterorhabditis* spp., de 15.16% con dosis de 50 JI/larva.

Cuadro 12. Comparación de medias de la mortalidad sobre *Tenebrio molitor* entre cepas evaluadas en tiempo de 24 horas.

Dosis JI/larva	Cepas por tiempo de 24 h					
	M5	M6	B7	MZ9	M18	MZ6
	<i>Steinernema</i> spp. (media +- SD)	<i>Steinernema</i> spp. (media +- SD)	<i>Steinernema</i> spp. (media +- SD)	<i>Heterorhabditis</i> spp. (media +- SD)	<i>Heterorhabditis</i> spp. (media +- SD)	<i>Heterorhabditis</i> spp. (media +- SD)
10	30.75 +- 19.04	24.02 +- 14.25	43.91 +- 12.48	45.16 +- 17.95	22.88 +- 12.39	40.16 +- 19.00
25	56.80 +- 17.97	35.36 +- 16.20	48.00 +- 14.05	36.36 +- 19.11	19.77 +- 18.46	44.33 +- 19.52
50	40.44 +- 9.41	31.33 +- 18.15	53.00 +- 18.16	15.16 +- 21.32	39.49 +- 21.38	42.05 +- 21.56
100	45.49 +- 17.42	47.52 +- 15.12	40.19 +- 17.29	28.52 +- 22.01	33.36 +- 24.71	44.55 +- 18.60
200	72.16 +- 17.16	36.19 +- 27.31	52.66 +- 25.77	21.91 +- 15.75	70.77 +- 13.66	42.63 +- 14.82

En el cuadro 13 se aprecia la máxima mortalidad para la cepa M5 *Steinernema* spp., de 98% con dosis de 200 JI/larva en tiempo de 48 h. Contrario la cepa M18 *Heterorhabditis* spp., con 24.88% en dosis de 10 JI/larva en 48 h.

Cuadro 13. Comparación de medias de la mortalidad sobre *Tenebrio molitor* entre cepas evaluadas en tiempo de 48 horas.

Cepas por tiempo de 48 h						
Dosis JI/larva	M5 <i>Steinernema</i> spp. (media +- SD)	M6 <i>Steinernema</i> spp. (media +- SD)	B7 <i>Steinernema</i> spp. (media +- SD)	MZ9 <i>Heterorhabditis</i> spp. (media +- SD)	M18 <i>Heterorhabditis</i> spp. (media +- SD)	MZ6 <i>Heterorhabditis</i> spp. (media +- SD)
10	66.55 +- 20.41	58.83 +- 17.83	66.27 +- 15.52	58.03 +- 19.28	24.88 +- 15.00	51.61 +- 30.30
25	80.33 +- 6.86	76.14 +- 13.61	65.16 +- 19.33	50.02 +- 13.44	25.25 +- 15.66	50.66 +- 24.70
50	92.44 +- 10.47	79.41 +- 14.94	60.55 +- 23.23	57.80 +- 18.65	44.94 +- 21.03	62.33 +- 26.18
100	84.66 +- 12.76	89.66 +- 10.79	57.33 +- 24.93	82.72 +- 13.87	48.50 +- 24.06	56.11 +- 24.89
200	98.00 +- 4.21	59.97 +- 38.87	67.33 +- 29.72	85.94 +- 7.89	75.00 + 13.88	53.08 +- 23.09

En el cuadro 14 se observa la comparación de medias en tiempo de 72 h para las cepas evaluadas. Especificando que las dosis de 25, 50, 100, 200 JI/larva causaron el 100% de mortalidad en la cepa M5 *Steinernema* spp., Contrario en la cepa M18 *Heterorhabditis* spp., obtuvo mortalidad menor de 30.36% con dosis de 25 JI/larva.

Cuadro 14. Comparación de medias de la mortalidad sobre *Tenebrio molitor* entre cepas evaluadas en tiempo de 72 horas.

Cepas por tiempo de 72 h						
Dosis JI/larva	M5 <i>Steinernema</i> spp. (media +- SD)	M6 <i>Steinernema</i> spp. (media +- SD)	B7 <i>Steinernema</i> spp. (media +- SD)	MZ9 <i>Heterorhabditis</i> spp. (media +- SD)	M18 <i>Heterorhabditis</i> spp. (media +- SD)	MZ6 <i>Heterorhabditis</i> spp. (media +- SD)
10	83.94 +- 13.15	77.09 +- 19.11	71.72 +- 13.85	64.16 +- 14.79	32.47 +- 15.02	56.83 +- 17.95
25	100 +- 0.00	87.19 +- 9.18	69.38 +- 18.25	69.94 +- 15.84	30.36 +- 15.78	55.02 +- 19.11
50	100 +- 0.00	95.55 +- 7.76	71.13 +- 22.98	73.6 +- 15.53	50.72 +- 21.80	70.44 +- 21.23
100	100 +- 0.00	97.00 +- 4.83	60.55 +- 22.78	92.52 +- 7.03	59.19 +- 21.41	72.02 +- 22.01
200	100 +- 0.00	65.55 +- 37.30	69.05 +- 30.52	92.41 +- 7.44	80.61 +- 13.25	62.69 +- 15.75

En el cuadro 15 se presenta la comparación de las medias en porcentajes de mortalidad. La cepa que actuó con mejor actividad larvicida fue M5 *Steinernema* spp., alcanzando mortalidad del 100% en 72 h. Coincidiendo con Andalo *et al.* (2014) que definieron la mortalidad para la especie *H. amazonensis* cepa RSC5 en larvas de *G. mellonella* con 100% en 72 h. Con respecto a la dosis de 25 JI/larva con relación al tiempo mostro 100% en 72 h, en el tiempo 48 h con relación a la dosis de 200 JI/larva causó 98% de mortalidad. Por lo tanto obteniendo un rango optimo con relación tiempo-dosis se considera para la dosis de 50 JI/larva que causó mortalidad de 92.44% en 48 h. Lo antes mencionado se observó en la cepa M5 *Steinernema* spp.

Cuadro 15. Comparación de medias de la mortalidad sobre *Tenebrio molitor* en dosis por tiempos de 24, 48, 72 horas

Dosis JI/larva	24 h % Mortalidad		48 h % Mortalidad		72 h % Mortalidad	
	Cepa	(media +- SD)	Cepa	(media +- SD)	Cepa	(media +- SD)
10	MZ9 H	45.16 +- 17.95	M5 S	66.55 +- 20.41	M5 S	83.94 +- 13.15
25	M5 S	56.80 +- 17.97	M5 S	80.33 +- 6.86	M5 S	100 +- 0.00
50	B7 S	53.00 +- 18.16	M5 S	92.44 +- 10.47	M5 S	100 +- 0.00
100	M6 S	47.52 +- 15.12	M6 S	89.66 +- 10.79	M5 S	100 +- 0.00
200	M5 S	72.16 +- 17.16	M5 S	98.00 +- 4.21	M5 S	100 +- 0.00

CONCLUSIONES

Se determinó la patogenicidad y virulencia de nematodos entomopatógenos nativos del Noreste de México sobre *T. molitor* en condiciones *in vitro*. Destacando con mayor actividad larvicida la cepa nativa M5 *Steinernema* spp., contrario con la cepa MZ9 *Heterorhabditis* spp., que presentó menor actividad larvicida.

Se evaluó la patogenicidad y virulencia de las seis cepas de nematodos entomopatógenos nativos del estado de Coahuila. Obteniendo porcentajes de mortalidad intermedios las cepas M6 *Steinernema* spp., M18 *Heterorhabditis* spp., B7 *Steinernema* spp., MZ6 *Heterorhabditis* spp.

Se calculó la dosis letal media (DL_{50} JI/larva) de las seis cepas evaluadas para eliminar el 50% de larvas de *T. molitor* siendo la mejor en este caso para la cepa MZ6 *Heterorhabditis* spp.

Las larvas de *T. molitor* son susceptibles a nematodos entomopatógenos, las cepas evaluadas presentaron diferencias altamente significativas. Mostrando que hay variabilidad de control entre cepas y géneros debido a diversos factores.

Los resultados muestran alta virulencia en todas las cepas evaluadas indicando que los nematodos entomopatógenos son muy eficientes como bioplaguicidas. Determinando que para establecer nematodos entomopatógenos nativos como bioplaguicidas en programas de manejo integrado de plagas, es importante evaluar primero sus propiedades; así como las características, los factores ambientales y los factores responsables de la efectividad biológica que pueda influir en los nematodos, para controlar plagas; como también conocer las características, mecanismos de defensas, factores bióticos y abióticos del hospedero.

LITERATURA CITADA

- Abbott**, W.S. 1925. A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18, 265 - 267.
- Akhurst**, R. J. 1989. Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp. Bacterium symbiotically associates with the insect pathogenic Nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. *Journal General Microbiology*, 1, 121 – 303.
- Alatorre**, R. R. 2012. Nematodos entomopatógenos En: Taller: Teoría de la aplicación de insecticidas microbianos. XXXV Congreso Nacional de Control Biológico. Puebla, México. Delgado-Gamboa *et al*: Revisión de Nematodos Entomopatógenos aislados en México.
- Alatorre**, R., y Kaya, H. R. 1990. Interespecific competition between entomopathogenic nematodes in the genera *Heterorhabditis* and *Steinernama* for an insect host in sand. *Journal of Invertebrate Pathology*, 55, 179 – 188.
- Alvarado**, O. A. 2012. Hábitos parásitos y comportamiento de un aislamiento nativo del nematodo entomopatógeno *Steinernema* spp. En larvas de *Galleria mellonella* L. Tesis de licenciatura. Universidad de Chile. Santiago Chile. P 21.
- Alves**, S. 1986. Control microbiano de insectos. Editorial Manole. 1° edición. Sao Paulo, Brasil. Pp 210 – 221.
- Ándalo**, V., Moreira, G. F., y Junior, A. M. 2014. *Heterorhabditis amazonensis* RRC5 (Rhabditida: Heterorhabditidae) movement and host recognition. *Revista colombiana de Entomología*, 40, 91 – 97.

- Arredondo**, H. C., Molina, O. J., y Hernández, V. M. 1999. Potencial de Nematodos Entomopatógenos en el control de plagas. 1ª edición. Colima, Col. México. P 17.
- Beavers**, J. B. y Calkins, C. O. 1984. Susceptibility of *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae) to *Steinernema* and *Heterorhabditis* nematodes in laboratory studies. *Environmental Entomology*, 13, 137 – 139.
- Bedding**, R. A. 1984. Large scale production storage and transport of the insect parasitic nematodes *Neoaplectana* spp. And *Heterorhabditis* spp. *Annals of Applied Biology*, 104, 117 - 120.
- Boemare**, N. E., Akhurst R. J., y Mourant, R. G. 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. Bacteriology*, 43, 249 - 255.
- Cagnolo**, R. S., y González, M. J. 2017. Comportamiento de localización y elección de hospedero del nematodo entomopatógenos *Steinernema rarum* (OLI) (nematoda: Steinernematidae). *Revista Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 4, 77 – 84.
- Castillo**, V. A. 1995. Nematodos parásitos de insectos. Memorias. VI Curso de control Biológico. Tapachula, Chiapas. Pp 81 – 88.
- Cepeda**, S. M. 1997. El control biológico como una alternativa en el manejo de poblaciones de Nematodos. Memoria. XX Congreso nacional de control biológico. Universidad de Guadalajara. Pp 195 – 197.
- Chitwood**, B. G. 1937. An Introduction to Nematology, (revised), monumental printing Co., Baltimore. 372 p.

- Choo**, H. K., Kaya, H. K., Burlando, T. M., y Gaugler, R. 1989. Entomopathogenic Nematodes: host finding ability in the presence of plants roots. *Environmental Entomology*, 18, 1136 - 1140.
- Doucet**, M. A., Doucet, M. E., y Nienstedt, K. 1992. Diferencias inter e intraespecifica en la capacidad infectiva de poblaciones de *Heterorhabditis* y *Steinernema* aislados en Argentina. *Nematropica*, 22, 237 – 242.
- Ehlersn**, R. U. 2001. Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. *Applied Microbiology Biotechnology*, 56, 523 – 633.
- FAO**. 2004. Contribution of insects of the forest food safety. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. FAO. Roma. 117 p.
- Finney**, D. J. 1971. Probit analysis: a statistical treatment of the sigmoid response curve. *Cambridge University Press*, 41, P 256.
- Finney**, J. R. y Bennet, G. F. 1984. Susceptibility of early instars of spruce budwron (Lepidoptera: tortricidae) to *Heterorhabditis heliothidis* (Nematoda: Rhabditidae). *Canadian Entomology*, 116, 285 – 287.
- Gaugler**, R. 1999. Ecological considerations in the biological control of soil inhabiting insects with entomopathogenic nematodes. *Agriculture Ecosystems and Envioremental*, 24, 351 – 360.
- Gaugler**, R. 2002. Entomopathogenic Nematology. Ed. Gaugler. R. CABI Publishing. 10° edición. USA, New York. 388 p.
- Gaugler**, R., Campbell F., y Gupta, P. 1991. Characterization and basis of nehaced host-finding in a genetically improved strain of *Steinernema carpocapsae*. *Journal Invertebrate. Pathology*, 41, 57 - 234.
- George**, O., y Poinar, G. O. 1979. Nematodes for Biological Control of insects. University of California. 3° edicion. Berkeley, California. Pp 165-167.

- Glaser**, R. W. 1932. Studies on *Neoplectana glasari* as bioinsecticidas in turf and ornamentals. In handbook of integrated pest management for turf an ornamentals. Ed. Leslie, A. N. CRC press inc. Baca raton, Florida. Pp 477 – 489.
- Grewal**, P., y Koppenhofer A., Choo H. 2005. Lawn, turfgrass and pasture applications. Ed. Grewal, P. S.; Ehlers, R-U.; Shapiro-Ilan, D. in. Nematodes as biocontrol agents. CABI, New York, USA. Pp 115 – 146.
- Guzmán**, F. A., y Alatorre R. R. 1999. Nematodos parásitos de insectos. Colegio de postgraduados. Instituto de fitosanidad. Montecillo, estado de México. 189 p.
<http://www.fao.org/docrep/x5053S/x5053s06.htm> (28, febrero, 2017)
- INIAP**. 2004. Identificación de nematodos entomopatógenos en las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. INIAP. Ecuador, Cuenca. Pp 6, 14 y 15.
- IPN**. 2014. Revisión de nematodos entomopatógenos aislados en México. Centro interdisciplinario de investigación para el desarrollo integral regional. Unidad Oaxaca. Sociedad mexicana de entomología. México, Oaxaca. P 284.
- James**, M., Malan, A. P., y Addison, P. 2017. Surveying and screening South African entomopathogenic nematodos for the control of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata* (Wiedemann). Crop Protection, 105, 41 – 48.
- Kaya**, H. K., y Gaugler, R. 1993. Entomopathogenics Nematodes. *Entomology Pathology*, 38, 181 - 206.
- Kaya**, H. K., y Stock, S. P. 1997. Techniques in insect nemalology: In Lacey, L. Ed. Manual of techniques in insect patholog y. academic press. San Diego, EUA. Pp 281 – 324.
- Lacey**, L. A. 2017. Microbial Control of Insect and Mite Pests From Theory to Practice. Sara tenney. Editorial Pat Gonzalez Amsterdam. Estados unidos. Pp 157 – 166.

- Lacey**, L., Frutos R., Kaya, H., y Vail, P. 2001. Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future. *Biological Control*, 21, 230 - 248.
- Lezama**, G., Alatorre, R., Bojalil, L., Molina, O., Arenas, V., Gonzalez, R., y Reblledo D. 1996. Virulence of Entomopathogenic fungi (imperfect fungi: Hyphomycetes) against the fall armyworm (Lepidoptera:Noctuidae) eggs and neonate larvae. *Revista Vedralia*, 3, 35 - 39.
- López**, P. A. s/f. Control Biológico de Insectos mediante nematodos entomopatógenos. BASF 26: 41 – 53.
- Monchan**, M. Vachare, S., Pavine, R., y Dararat, H. 2011. Pathogenicity and cultura of a *Heterorhabditis indica* isolate from Thailand. *Nematropica*, 4, 52 – 61.
- Mracek**, Z., Becuar, S., Kindlman, P., y Webster, J. M. 1999. Factors influencinig the infectivity of Canadian isolate of *Steinernema krausari* (nematoda: Steinernematidae) at low tempereture. *Journal of Invertebrate Pathology*, 73, 243 – 247.
- Ngo-Kanga**, F., Waeyenberge L., Hauser S., y Moens M. 2012. Distribution of Entomopathogenic Nematodes in Southern Cameroon. *Journal of Invertebrate Pathology*, 41, 51 - 109.
- Nguyen**, K. B. 1999. Family Steinernematidae, Heterorhabditidae: diagnostic and characters. Entomology and Nematology Department. University of Florida. U.S.A. Pp 59 – 109.
- Nguyen**, K. B., y Smart, G. C. 1990. Vertical dispersal of *steinernema scapteriscis*. *Journal Nematology*, 2, 574 – 578.
- Nguyen**, K. B., y Smart, G. C. 1992. *Steinernema neocurtillis* n sp. (Rhabditida: Steinernematidae) and a key to species of the genus *Steinernema*. *Journal Nematology*, 4, 463 - 477.

- Nguyen, K. B., y Smart, G. C.** 1996. Identification of entomopathogenic nematodes in the Steinernematidae and Heterorhabditidae (Nemata: Rhabditidae). *Journal Nematology*, 28, 286 – 300.
- Poinar, G. O.** 1975. Entomogenous nematodes, a manual and host list of insect-nematode associations. Ed. E. J. Brill, Leiden, Pp 317.
- Poinar, G. O.** 1976. Description and biology of a new insect parasitic Rhabditoid *Heterorhabditis bacteriophora* n. gen. n. sp. (Rhabditida; Heterorhabditidae n. fam.). *Journal Nematology*, 21, 463 - 470.
- Poinar, G. O.** 1979. Nematodes for biological control of insects. Ed: Gaugler, R. y H. K. Kaya (eds). Entomopathogenic Nematodes in biological control. CRC Press. Boca Raton FL., USA. 3654 p.
- Poinar, G. O.** 1989. Non-insect hosts for the Entomogenous rhabditoid nematodes *Neoaplectana* (Steinernematidae) *Heterorhabditis* (Heterorhabditidae). *Journal Nematology*, 12, 423 - 428.
- Poinar, G. O.** 1990. Biology and Taxonomy of Steinernematidae and heterorhabditidae, Pp 23 - 61. Ed: Gaugler, R. & H. K. Kaya (eds). Entomopathogenic Nematodes in biological control. CRC Press Boca Raton, F. L. USA. 3654 p.
- Rodríguez, L. A.** 2012. Bases ecológicas del control biológico. En memorias del XXIII Curso Nacional de Control Biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico. Puebla, México.
- Ruiz, V. J., Cortes, M. C., y Silvia, R. M.** 2017. Efectos de la aplicación de hongos y nematodos entomopatógenos sobre la mortalidad de larvas de *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae). *Entomología mexicana*, 4, 156 – 160.
- Saenz, A. A.** 2000. Cultivo *in vivo* y método de almacenamiento para juveniles infectivos de *Steinernema feltiae* Filipjev (Rhabditida: Steinernematidae). *Agronómica colombiana*, 21, 59 – 64.

- Sáenz**, A. A. 2005. Importancia de los Nematodos Entomopatógenos para el control biológico de plagas en palma de aceite. *Palmas*, 26, 41 - 57.
- Salas**, M., González, R., Lezama, R., Rebolledo, D., y Molina, O. 2000. Existencia de nematodos entomopatógenos (Steinernematidae y Heterorhabditidae) en agroecosistemas del cañón de Juchipila, Zacatecas, México. *Palmas*, 45, 205 – 263.
- Sas**, 1988. Principales plagas del maíz. Dirección general de sanidad. Talleres de los graficos de la nación. Mexico, D. F. Pp 29 – 32.
- Shapiro**, I. D., Lewis, E. E., y Tedders, W. L. 2003. Superior efficacy observed in entomopathogenic nematodes applied infected-host cadavers compared with application in aqueous suspensión. *Journal Invertebrate Pathology*, 83, 270 – 272.
- Shapiro**, I. D., Morales, A. J., y Rojas, M. G. 2016. *In vivo* production of entomopathogenic nematodes. *Methods in molecular biology*, 1477, 137 – 158.
- Treviño**, C. D., 2015. Hongos Nematofagos del genero *Arthrobotrys* spp., en el control de *Meloidogyne incognita* bajo condiciones *in vitro*. Tesis de maestría. UAAAN. Saltillo, Coahuila. Pp 32.
- Vazquez**, L. A. 2006. Detección, identificación y distribución natural de nematodos entomopatógenos (Heterorhabditidae y Steinernematidae) en sistemas agroecológicos de Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Tesis de licenciatura. UAAAN. Saltillo, Coahuila. P 8.
- White**, G. F. 1927. A method for obtaining infective nematode larva from cultures. *Science*, 66, 302 – 303.
- Womersley**, C. Z., y Gaugler, R. 1990. Dehydration survival and anhydrobiotic potential. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19922317292>. (10, enero, 2018).

Woodring, J. L., y **Kaya**, H. K. 1988. Steinernematidae and Heterorhabditidae Nematodes: a handbook of techniques. Southern Cooperative Series. Arkansas Agricultural Experimental Station Fayetteville, Arkansas, USA, 30 p.

Yepez, T. G. 1972. Los Nematodos enemigos de la agricultura. Maracay, estado Aragua. Interciencia, 42 – 44.

APÉNDICE

Apéndice 1.

Análisis PROBIT para determinar dosis letal media (cepa M6 *Steinernema* spp.)

Procedimiento <u>Probit</u>			
Tipo III Análisis de efectos			
Efecto	DF	Chi-cuadrado de <u>Wald</u>	Pr > <u>ChiSq</u>
<u>Log10(Dosis)</u>	1	2.8080	0.0938

Análisis <u>Probit</u> en Dosis			
Probabilidad	Dosis	95% Límites <u>fiduciales</u>	
0.01	0.0000463	.	.
0.02	0.0003260	.	.
0.03	0.00113	.	.
0.04	0.00286	.	.
0.05	0.00610	.	.
0.06	0.01162	.	.
0.07	0.02046	.	.
0.08	0.03396	.	.
0.09	0.05383	.	.
0.10	0.08225	.	.
0.15	0.47601	.	.
0.20	1.92130	.	.
0.25	6.36016	.	.
0.30	18.63506	.	.
0.35	50.46015	.	.
0.40	129.85555	.	.
0.45	324.06759	.	.
0.50	797.10150	.	.
0.55	1961	.	.
0.60	4893	.	.
0.65	12592	.	.
0.70	34095	.	.
0.75	99899	.	.
0.80	330699	.	.
0.85	1334778	.	.
0.90	7724414	.	.
0.91	11803801	.	.
0.92	18710386	.	.
0.93	31049913	.	.
0.94	54668977	.	.
0.95	104217565	.	.
0.96	222402580	.	.
0.97	564739315	.	.
0.98	1949113218	.	.
0.99	1.37333E10	.	.

Apéndice 2.

Análisis PROBIT para determinar dosis letal media (cepa M18 *Heterorhabditis* spp.)

Procedimiento Probit

Tipo III Análisis de efectos

Efecto	DF	Chi-cuadrado de <u>Wald</u>	Pr > <u>ChiSq</u>
<u>Log10(Dosis)</u>	1	7.0553	0.0079

Análisis Probit en Dosis

Probabilidad	Dosis	95% <u>Limites fiduciales</u>	
0.01	0.35204	.	.
0.02	0.69357	.	.
0.03	1.06644	.	.
0.04	1.47399	.	.
0.05	1.91790	.	.
0.06	2.39962	.	.
0.07	2.92058	.	.
0.08	3.48232	.	.
0.09	4.08650	.	.
0.10	4.73490	.	.
0.15	8.71199	.	.
0.20	14.14417	.	.
0.25	21.43549	.	.
0.30	31.13711	.	.
0.35	44.00780	.	.
0.40	61.10876	.	.
0.45	83.95477	.	.
0.50	114.76255	.	.
0.55	156.87547	.	.
0.60	215.52463	.	.
0.65	299.27523	.	.
0.70	422.98226	.	.
0.75	614.42236	.	.
0.80	931.15719	.	.
0.85	1512	.	.
0.90	2782	.	.
0.91	3223	.	.
0.92	3782	.	.
0.93	4510	.	.
0.94	5489	.	.
0.95	6867	.	.
0.96	8935	.	.
0.97	12350	.	.
0.98	18989	.	.
0.99	37412	.	.

Apéndice 3.

Análisis PROBIT para determinar dosis letal media (cepa M5 *Steinernema* spp.)

Procedimiento <u>Probit</u>			
Tipo III Análisis de efectos			
Efecto	DF	Chi-cuadrado de <u>Wald</u>	Pr > <u>ChiSq</u>
<u>Log10(Dosis)</u>	1	3.1032	0.0781

Análisis <u>Probit</u> en Dosis		
Probabilidad	Dosis	95% Límites <u>fiduciales</u>
0.01	0.00525	. .
0.02	0.01543	. .
0.03	0.03059	. .
0.04	0.05119	. .
0.05	0.07782	. .
0.06	0.11116	. .
0.07	0.15195	. .
0.08	0.20102	. .
0.09	0.25929	. .
0.10	0.32775	. .
0.15	0.86467	. .
0.20	1.86935	. .
0.25	3.62206	. .
0.30	6.56035	. .
0.35	11.37565	. .
0.40	19.17832	. .
0.45	31.78890	. .
0.50	52.27100	. .
0.55	85.95006	. .
0.60	142.46594	. .
0.65	240.18475	. .
0.70	416.48052	. .
0.75	754.33878	. .
0.80	1462	. .
0.85	3160	. .
0.90	8336	. .
0.91	10537	. .
0.92	13592	. .
0.93	17982	. .
0.94	24580	. .
0.95	35109	. .
0.96	53373	. .
0.97	89320	. .
0.98	177101	. .
0.99	520909	. .

Apéndice 4.

Análisis PROBIT para determinar dosis letal media (cepa MZ6 *Heterorhabditis* spp.)

Procedimiento <u>Probit</u>			
Tipo III Análisis de efectos			
Efecto	DF	Chi-cuadrado de <u>Wald</u>	Pr > <u>ChiSq</u>
Análisis <u>Probit</u> en Dosis			
Probabilidad	Dosis	95% Límites <u>fiduciales</u>	
0.01	4.9879E-47	.	.
0.02	6.319E-41	.	.
0.03	4.7059E-37	.	.
0.04	3.8494E-34	.	.
0.05	9.0092E-32	.	.
0.06	9.3611E-30	.	.
0.07	5.4894E-28	.	.
0.08	2.1025E-26	.	.
0.09	5.7891E-25	.	.
0.10	1.2247E-23	.	.
0.15	3.763E-18	.	.
0.20	8.6464E-14	.	.
0.25	4.7692E-10	.	.
0.30	1.09277E-6	.	.
0.35	0.00142	.	.
0.40	1.27840	.	.
0.45	922.98901	.	.
0.50	600353	.	.
0.55	390495772	.	.
0.60	2.81934E11	.	.
0.65	2.53902E14	.	.
0.70	3.29825E17	.	.
0.75	7.55729E20	.	.
0.80	4.16848E24	.	.
0.85	9.57817E28	.	.
0.90	2.94307E34	.	.
0.91	6.2259E35	.	.
0.92	1.71424E37	.	.
0.93	6.56575E38	.	.
0.94	3.85022E40	.	.
0.95	4.00063E42	.	.
0.96	9.3632E44	.	.
0.97	7.659E47	.	.
0.98	5.70378E51	.	.
0.99	7.22602E57	.	.

Apéndice 5.

Análisis PROBIT para determinar dosis letal media (cepa MZ9 *Heterorhabditi* spp.)

Procedimiento <u>Probit</u>			
Tipo III Análisis de efectos			
Efecto	DF	Chi-cuadrado de <u>Wald</u>	Pr > <u>ChiSq</u>
<u>Log10(Dosis)</u>	1	3.8564	0.0496

<u>Análisis Probit en Dosis</u>			
Probabilidad	Dosis	95% Límites <u>fiduciales</u>	
0.01	161892	.	.
0.02	46367	.	.
0.03	20974	.	.
0.04	11548	.	.
0.05	7107	.	.
0.06	4702	.	.
0.07	3273	.	.
0.08	2366	.	.
0.09	1762	.	.
0.10	1343	.	.
0.15	436.25126	.	.
0.20	178.51479	.	.
0.25	82.93754	.	.
0.30	41.66544	.	.
0.35	22.01562	.	.
0.40	12.01828	.	.
0.45	6.69105	.	.
0.50	3.75992	.	.
0.55	2.11283	.	.
0.60	1.17629	.	.
0.65	0.64214	.	.
0.70	0.33930	.	.
0.75	0.17045	.	.
0.80	0.07919	.	.
0.85	0.03241	.	.
0.90	0.01053	.	.
0.91	0.00802	.	.
0.92	0.00597	.	.
0.93	0.00432	.	.
0.94	0.00301	.	.
0.95	0.00199	.	.
0.96	0.00122	.	.
0.97	0.0006740	.	.
0.98	0.0003049	.	.
0.99	0.0000873	.	.

Apéndice 6.

Análisis PROBIT para determinar dosis letal media (cepa B7 *Steinernema* spp.)

Procedimiento <u>Probit</u>			
Tipo III Análisis de efectos			
Efecto	DF	Chi-cuadrado de <u>Wald</u>	Pr > <u>ChiSq</u>
<u>Log10(Dosis)</u>	1	0.4768	0.4899

Análisis <u>Probit</u> en Dosis			
Probabilidad	Dosis	95% Límites <u>fiduciales</u>	
0.01	1.2909E-25	.	.
0.02	2.0116E-22	.	.
0.03	2.1339E-20	.	.
0.04	7.1284E-19	.	.
0.05	1.2374E-17	.	.
0.06	1.4044E-16	.	.
0.07	1.1818E-15	.	.
0.08	7.958E-15	.	.
0.09	4.509E-14	.	.
0.10	2.2257E-13	.	.
0.15	1.653E-10	.	.
0.20	3.16151E-8	.	.
0.25	2.86633E-6	.	.
0.30	0.0001641	.	.
0.35	0.00698	.	.
0.40	0.24531	.	.
0.45	7.67651	.	.
0.50	227.45765	.	.
0.55	6740	.	.
0.60	210903	.	.
0.65	7408761	.	.
0.70	315239686	.	.
0.75	1.80499E10	.	.
0.80	1.63646E12	.	.
0.85	3.12991E14	.	.
0.90	2.32455E17	.	.
0.91	1.14743E18	.	.
0.92	6.50123E18	.	.
0.93	4.37781E19	.	.
0.94	3.68379E20	.	.
0.95	4.18124E21	.	.
0.96	7.25784E22	.	.
0.97	2.42447E24	.	.
0.98	2.57192E26	.	.
0.99	4.00789E29	.	.