



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN  
EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

“CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE NEMATODOS  
ENTOMOPATÓGENOS SOBRE NINFAS DE MOSCA PINTA,  
*Aeneolamia spp.* Y *Prosapia spp.* (HEMIPTERA: CERCOPIDAE)

EN EL CULTIVO DE CAÑA DE AZÚCAR”

NOMBRE DEL ALUMNO

**Pedro Fabián Grifaldo Alcántara**

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**



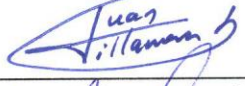
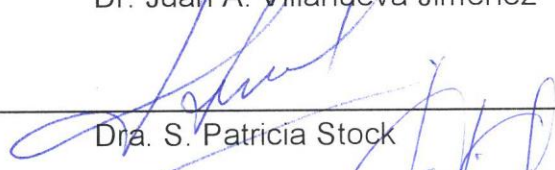
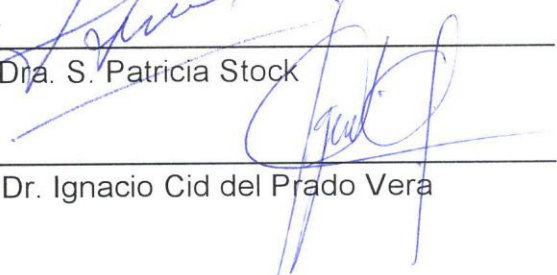
MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2017

La presente tesis titulada “**CARACTERIZACION Y EVALUACIÓN DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS SOBRE NINFAS DE MOSCA PINTA, *Aeneolamia sp.* Y *Prosapia spp.* (HEMIPTERA: CERCOPIDAE) EN EL CULTIVO DE CAÑA DE AZÚCAR**”, realizada por el alumno Grifaldo Alcántara Pedro Fabián bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS  
FITOSANIDAD  
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

**CONSEJO PARTICULAR**

CONSEJERO	 _____
	Dra. Raquel Alatorre Rosas
ASESOR	 _____
	Dr. Francisco Hernández Rosas
ASESOR	 _____
	Dr. Juan A. Villanueva Jiménez
ASESOR	 _____
	Dra. S. Patricia Stock
ASESOR	 _____
	Dr. Ignacio Cid del Prado Vera

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Enero 2017

**CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE NEMATODOS  
ENTOMOPATÓGENOS SOBRE NINFAS DE MOSCA PINTA, *Aeneolamia* spp.  
Y *Prosapia* spp. (HEMIPTERA: CERCOPIDAE) EN EL CULTIVO DE CAÑA DE  
AZÚCAR**

Grifaldo Alcántara, Pedro Fabián  
Colegio de Postgraduados, 2017

**RESUMEN**

En el estado de Veracruz, México, se realizó la búsqueda de nematodos entomopatógenos (NEP) en suelos de ingenios cañeros. A través de trampeo con larvas de la polilla de la cera *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) como “insectos cebo”, se obtuvieron dos cepas de nematodos pertenecientes a las familias Heterorhabditidae y Steinernematidae. Las cepas fueron identificadas mediante caracteres morfológicos, morfométricos y por medio de herramientas moleculares. La cepa CP13JA fue identificada como *Heterorhabditis indica* y fue aislada en parcelas del ingenio La Gloria. La cepa CP13ES fue identificada como una posible nueva especie del género *Steinernema* sp. aislada en parcelas del ingenio Constanca. Se consideró a *Steinernema* sp. taxonómicamente muy cercana a *S. riobrave* y filogenéticamente relacionada con especies del grupo IV (*bicornutum-certophorum-riobrave*). Este grupo IV se caracteriza por presentar juveniles infectivos con papilas laterales proyectadas en forma de “cuernos”. Los juveniles infectivos (JI) de *Steinernema* sp. CP13ES se diferencian de otras especies de este grupo por presentar los JI más pequeños que oscila entre 409 a 566µm (498µm ± 6.5). Además como característica particular presenta anastomosis en la cutícula en la región ventral, la cual está ubicada posteriormente al poro excretor hasta antes del inicio del ano. Las hembras de 1ª y 2ª generación de *Steinernema* sp. presentan la vulva ubicada al 60% del cuerpo. Las hembras de 1ª generación presentan además un mucrón al final de la cola, mientras que las hembras de 2ª generación poseen un hinchamiento en el labio anal posterior. La terminación de la cola de los machos de 1ª generación es

redonda, mientras que los machos de 2<sup>a</sup> generación presentan una espina caudal. Como característica biológica importante, se observó que los juveniles infectivos de *Steinernema sp.* emergen en el 5<sup>o</sup> al 6<sup>o</sup> día post-infección, cuando las larvas infectadas de *G. mellonella* son expuestas a 30-35°C. La emergencia de los juveniles infectivos ocurre en el 11<sup>vo</sup> post-infección cuando los insectos son infectados a 22-25°C.

En este estudio se evaluó la virulencia de estas cepas en ninfas de mosca pinta (*Aeneolamia spp.* y *Prosapia spp.*) en campo, en lotes de caña de azúcar localizados cerca de los ingenios Constancia y Potrero de Veracruz, México. En el primer ensayo se aplicaron las dos cepas de NEP + dispersante (BREAK-THRU®) en 30 mL ha<sup>-1</sup>, así como el testigo (agua) + dispersante. En el segundo ensayo se evaluó la cepa *Steinernema sp.* + dispersante y el testigo + dispersante. La dosis utilizada en ambos experimentos fue de 66,000 JI m<sup>-2</sup> en 19 L de agua. En el primer ensayo, la mortalidad observada en *H. indica* fue 73% y 62% en *Steinernema sp.* En el segundo ensayo, la población de salivazo se redujo significativamente (P= 0.0001) posterior a la aplicación de *Steinernema sp.* + dispersante; comparado con el testigo, cuya tendencia fue aumentar las poblaciones en el tiempo.

**Palabras clave:** Bioinsecticida, control biológico, descripción, filogenia, salivazo, taxonomía.

**CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF ENTOMOPATHOGENIC  
NEMATODES ON NYMPHS OF *Aeneolamia* spp. AND *Prosapia* spp.  
(HEMIPTERA: CERCOPIDAE) IN SUGAR CANE FIELDS**

Grifaldo Alcántara, Pedro Fabián  
Colegio de Postgraduados, 2017

**ABSTRACT**

In the state of Veracruz, Mexico, the search for entomopathogenic nematodes (EPN) was conducted in soils of sugarcane fields. Through insect baiting with larvae *G. mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) as “bait insects”, two strains of nematodes were obtained to the families Heterorhabditidae and Steinernematidae. The two strains were identified by morphological, morphometric and molecular tools. The strain CP13JA was identified as *Heterorhabditis indica* isolated in plots of the La Gloria mills. Whereas strain CP13ES was identified as a possible new species of the genus *Steinernema* sp. isolated on plots of Constanca mills. This species is related taxonomically close to *S. riobrave* and phylogenetically related to species of the group IV (*bicornutum-certophorum-riobrave*). This group IV is characterized by presenting infective juveniles with lateral papillae projected in the form of “horns-like”. The infective juveniles (IJ) of *Steinernema* sp. CP13ES characterized by the infective juveniles ranging from 409 to 566µm (498µm ± 6.5), which are shorter than the IJ of other species in this clade. In addition, the IJ present anastomosis in the cuticle in the ventral region, which extends from the excretory pore to the beginning of the anus. The females of 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> generation of *Steinernema* sp. present the vulva located at 60% of the body. 1<sup>st</sup> generation females have a mucronated tail, whereas 2<sup>nd</sup> generation females present a postanal swelling. 1<sup>st</sup> generation males are characterized by a round and non-mucronated tail. 2<sup>nd</sup> generation male have tail with a caudal spine. As important biological characteristic, was observed that the infective juveniles of *Steinernema* sp. emerge in 5<sup>th</sup> to 6<sup>th</sup> days post-infection, when infected *G. mellonella* larvae are

exposed at 30-35° C. The emergence of infective juveniles occurs in the 11<sup>th</sup> post-infection when the insects are infected at 22-25° C.

We conducted field trails to assess the virulence of these strains in fields of nymphs of spittlebugs (*Aeneolamia* spp. and *Prosapia* spp.) in sugarcane fields located near the Constancia and Potrero mills in Veracruz, Mexico. In the first assay the two strains of EPN + dispersant (BREAK-THRU®) were applied in 30 mL ha<sup>-1</sup>. The control consisted of water + dispersant alone. In the second trail, we only tested the effect of *Steinernema* sp. strain CP13ES + dispersant. The control consisted of water + dispersant only. Nematode suspension considered a dose of 66,000 JI m<sup>-2</sup> in 19 L in water in both experiments. In trial one, *H. indica* showed the highest nymph mortality 73% followed by 62% *Steinernema* sp. In the second trial, the combined application of CP13ES + dispersant caused a reduction in the spittlebugs population ( $P = 0.0001$ ); compared to the control, whose tendency was to increase populations over time.

**Key words:** Bioinsecticides, biological control, description, phylogeny, spittlebugs, taxonomy.

## DEDICATORIA

*A tí, por ser mí corazón, mí fuerza y mí esperanza; mí luz que brilla en el cielo, en esas noches donde no hay más que oscuridad, mí perfecta aura plateada inmensa, perfecta y omnipresente. Tú, pedazo de mí, pieza perfecta de Dios, mí pequeño pedazo de Luna.*

*A mí pareja Domy Martínez quien me ha apoyado en todos los aspectos y ha sido una pieza clave en la culminación de este proyecto de vida. Te amo. A mis pequeños Rafael y Manuel quienes también forman parte de este hermoso sueño.*

*A mis padres Ruth Alcántara y Joel Grifaldo; seres de luz que han iluminado mí camino desde los inicios del tiempo, voces llenas de sabiduría que han orientado mis caminos. Seres hechos de estrellas que guían mí vida; les amo por siempre estar en todos mis sueños.*

*A mis hermanos Mary, Inés, Sílvia, Héctor y Joel; así como a mis respectivos cuñados y cuñadas, sobrinos y sobrinas que son siempre la fuerza de mí familia y me demuestran día a día mucho de su perpetuo amor.*

## **AGRADECIMIENTOS**

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo recibido para la realización de mis estudios de Posgrado.*

*Al Colegio de Posgraduados Campus Montecillo por brindarme la oportunidad de permanecer nuevamente en sus instalaciones.*

*A la Dra. Raquel Alatorre Rosas, quien desde mis estudios de maestría hasta estos momentos, me ha apoyado incondicionalmente. Mil gracias por compartirme sus conocimientos y descubrir que hay una formidable persona en usted.*

*Al Dr. Juan Antonio Villanueva Jiménez y su apreciable esposa. Gracias Dr. por brindarme su formidable apoyo en la revisión de cada detalle de la tesis, por su confianza, su apoyo y saber que el tener su amistad y haberme transmitido su conocimiento y paciencia es para mí de gran valor.*

*A la Dra. Hilda Silva Rojas, por su apoyo, conocimiento y disposición siempre y en cada momento que lo necesitaba.*

*A la Dra. S. Patricia Stock, cuyas atenciones estuvieron presentes para la realización de esta tesis desde el inicio de la misma hasta su culminación.*

*Al Dr. Ignacio Cid del Prado Vera, por sus observaciones para el enriquecimiento de este trabajo y su amplia experiencia.*

*Al Dr. Francisco Hernández Rosas, quien ha estado apoyándome en todas mis salidas de campo en el estado de Veracruz, desde mis estudios de maestría hasta este momento.*



*Al Dr. Jesús Romero Nápoles, por sus enseñanzas, su respaldo, sus consejos, por regalarme su tiempo para escucharme y orientarme. Conocer investigadores como usted, es invaluable.*

*Al M. en C. Jorge Valdez Carrasco, por brindarme su tiempo, asesorías y orientación para la toma de fotografías y su edición. Así también su amistad en este largo recorrido de mi estancia en el Colegio de Postgraduados.*

*Al hermoso estado de Veracruz en donde realice mis estudios de campo. A los ingenieros Guadalupe Olivos Medina y José Velázquez Alonso, Gerente y Supervisor de Campo del Ingenio Constancia. A los ingenieros Fernando Martínez Sánchez y Arturo Martínez Rivera, Gerente y Supervisor de Campo del Ingenio Potrero, así como a todo el personal que apoyaron en las diferentes labores realizadas para esta investigación.*

*En especial a Jorge Hernández, y mis amigos Sarah Patiño, Carmela Hernández, Jorge Zambrano, Oscar Castillo, Francisco Sotelo, Margarita Martínez; por su apoyo constante y su calidez de cada día. Gracias por sus múltiples sonrisas denotando siempre amistad.*

*A Silvia Colín, Ilaris y Macrina, por todas sus atenciones e infinita amabilidad en el servicio siempre brindado.*

*A todos aquellos que de alguna manera me fortalecieron con una sonrisa, con una voz de esperanza, por ser los oídos de mis muchas palabras y otras veces ser palabras de fuerza y valor. . . Gracias.*

*Es bueno amar tanto como se pueda, porque ahí radica la verdadera fuerza y el que mucho ama realiza grandes cosas y se siente capaz; porque lo que se hace por amor, está bien hecho.*

*Vincent Van Gogh*

*Todo el mundo es un genio, pero si juzgas a un pez por su habilidad para trepar un árbol, vivirá toda su vida creyendo que es un estúpido.*

*Albert Einstein*

*Gracias Dios por tu permanencia,  
por mostrarme tus múltiples rostros.  
Por reconocerte en el silencio, de la soledad  
en esa luz que siempre me dejas ver.*

## CONTENIDO

RESUMEN.....	iii
ABSTRACT.....	v
DEDICATORIA.....	vii
AGRADECIMIENTOS.....	viii
CONTENIDO.....	xi
ÍNDICE DE CUADROS.....	xvi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xviii
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Mosca Pinta o Salivazo (Hemiptera: Cercopidae).....	3
2.2 Situación Taxonómica.....	4
2.3 Ciclo de Vida.....	5
2.3.1 Género <i>Aeneolamia</i> spp. Fennah (1949).....	6
2.3.2 Género <i>Prosapia</i> spp. Fennah (1953).....	8
2.4 Daño en los Cultivos.....	9
2.5 Control de la Mosca Pinta.....	11
2.5.1 Control químico.....	11
2.5.2 Control cultural.....	12
2.5.3 Resistencia varietal.....	12

2.5.4 Control biológico.....	13
2.5.4.1 Parasitoides y depredadores.....	14
2.5.4.2 Entomopatógenos.....	14
2.5.4.2.1 Ciclo de vida de <i>Steinernema</i> spp. y <i>Heterorhabditis</i> spp.....	15
2.6 Literatura Citada.....	17
HIPÓTESIS.....	27
OBJETIVO GENERAL.....	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
CAPÍTULO 3. IDENTIFICACIÓN DE DOS NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS <i>Steinernema</i> sp. Y <i>Heterorhabditis indica</i> (CP13JA) EXTRAÍDOS DE SUELO EN CAÑA DE AZÚCAR DE VERACRUZ, MÉXICO.....	28
Resumen.....	28
Palabras clave.....	29
3.1 Introducción.....	29
3.2 Materiales y Métodos.....	30
3.2.1 Origen de los nematodos entomopatógenos.....	30
3.2.2 Caracterización morfométrica: Microscopia de luz.....	31
3.2.3 Microscopia electrónica de barrido (MEB).....	32
3.3 Análisis Molecular.....	32
3.3.1 Reconstrucción filogenética.....	34
3.4 Resultados.....	34

3.4.1 Descripción de <i>Steinernema</i> sp. cepa CP13ES.....	34
3.4.1.1 Machos primera generación.....	34
3.4.1.2 Machos de segunda generación.....	38
3.4.1.3 Hembras primera generación.....	38
3.4.1.4 Hembras de segunda generación.....	39
3.4.1.5 Juveniles infectivos.....	39
3.4.2 Localidad y hospedero.....	41
3.4.2.1 Etimología.....	44
3.4.2.2 Especímenes tipo.....	44
3.4.3 Análisis molecular y posición filogenética.....	44
3.5 Diagnósis.....	49
3.6 Discusión.....	51
3.5.1 Observaciones biológicas.....	53
3.5.2 Hibridación cruzada para <i>Steinernema</i> sp. CP13ES.....	53
3.5.3 Clave en base a las características diferenciales para la identificación de nematodos del género <i>Steinernema</i> pertenecientes al grupo IV <i>bicornutum-ceratophorum-riobrave</i> (Spiridonov <i>et al.</i> , 2004) .....	54
CAPÍTULO 4. CARACTERIZACIÓN DE <i>Heterorhabditis indica</i> (Poinar <i>et al.</i> , 1992) AISLAMIENTO CP13JA.....	
4.1 Machos.....	57
4.2 Hembras.....	57
4.3 Juveniles Infectivos.....	57
4.4 Localidad y Hospedero.....	58

4.4.1. Etimología.....	58
4.4.2 Especímenes tipo.....	60
4.4.3 Caracterización molecular.....	61
4.5 Discusión.....	61
4.6 Conclusión.....	62
4.7 Literatura Citada.....	62
CAPÍTULO 5. CONTROL DEL SALVAZO (HEMIPTERA: CERCOPIDAE) EN CAÑA DE AZÚCAR CON DOS ESPECIES NATIVAS DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS EN MÉXICO.....	69
RESUMEN.....	69
5.1	
Introducción.....	70
5.2 Materiales y Métodos.....	72
5.2.1 Cepas de NEP utilizados y forma de aplicación.....	72
5.2.2 Características de los sitios experimentales.....	73
5.2.3 Condiciones ambientales previas y durante la aplicación.....	74
5.3 Ensayo 1: Aplicación en Campo de <i>Steinernema</i> sp. Cepa CP13ES y <i>Heterorhabditis indica</i> .....	74
5.3.1 Evaluación de los NEP sobre ninfas de salvazo.....	77
5.4 Ensayo 2: Valoración de <i>Steinernema</i> sp. Cepa CP13ES sobre Ninfas de Salvazo.....	78
5.7 Resultados.....	80

5.8 Discusión.....	85
5.9 Literatura citada.....	88
CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN GENERAL.....	94

## ÍNDICE DE CUADROS

- Cuadro 1. Morfometría de machos y hembras de primera generación, y juveniles infectivos de *Steinernema* sp. cepa CP13ES. Indicando promedio, error estándar, así como el mínimo y máximo de las medidas obtenidas. TBL= ancho total del cuerpo, MBW= anchura media del cuerpo, EP= distancia de la región al poro excretor, NR= distancia de la región anterior al anillo nervioso, ES= largo total del esófago, TL= largo de la cola, ABW= anchura media del ano, SpL= largo de las espículas, GuL= largo del gubernáculo.....41
- Cuadro 2. Comparación morfológica y morfométrica de JI (juveniles infectivos), machos y hembras de primera y segunda generación de especies pertenecientes al grupo IV, nematodos con “tipo cuernos” *S. bicornutum*-*S. ceratophorum*-*S. riobrave*.....43
- Cuadro 3. Alineamiento de secuencias de la región ITS de cuatro especies del grupo *bicornutum-ceratophorum-riobrave* que presentan tipo cuernos en la región labial de los juveniles infectivos, que muestran los cambios de nucleótidos entre ellos.....45
- Cuadro 4. Comparación morfométrica de machos y hembras de segunda generación, y juveniles infectivos del aislamiento *Heterorhabditis indica* (CP13JA) y *H. indica* (Poinar Jr., 1992). Indicando promedio, error estándar, así como el mínimo y máximo de las medidas obtenidas. TBL= ancho total del cuerpo, MBW= anchura media del cuerpo, EP= distancia de la región al poro excretor, NR= distancia de la región anterior al anillo nervioso, ES= largo total del esófago, TL= largo de la cola, ABW= anchura media del ano, SpL= largo de las espículas, GuL= largo del gubernáculo.....60
- Cuadro 5. Localidades del estado de Veracruz, México donde se aplicaron los nematodos entomopatógenos nativos sobre ninfas de salivazo en caña de azúcar.....79
- Cuadro 6. Prueba de hipótesis que presenta las diferencias en sobrevivencia de ninfas de salivazo en caña de azúcar tratadas con *Steinernema* sp. + dispersante, y el testigo + dispersante, evaluados a través del tiempo.....83



Cuadro 7. Presencia de especies de salivazo o mosca pinta en las localidades donde se aplicaron los nematodos entomopatógenos nativos en Veracruz, México.....84

Cuadro 8. Características del suelo en las localidades del estado de Veracruz, México, donde se evaluó *Steinernema* sp. y *H. indica* contra ninfas de salivazo en caña de azúcar.....85

## INDICE DE FIGURAS

- Figura 1. *Aeneolamia contigua* (izquierda) y *Aeneolamia albofasciata* (derecha); muestran la coloración característica de las alas.....7
- Figura 2. *Proasapia simulans*; mostrando dos diferentes tipos de coloración en los bandeos de las alas. Pronoto con banda brillante o tenue, característica del género.....8
- Figura 3. *Steinernema* sp. CP13ES. Microscopia de luz. A y B, machos de primera generación: A, región anterior; B, región posterior; C y D, corresponden al estadio J1: C, región anterior del cuerpo; D, región posterior; E y F, machos de segunda generación en región anterior y posterior respectivamente, resaltando la presencia de una espina caudal. G, hembra de primera generación con mucrón al término de la cola; H, hembra de segunda generación con vulva al 60%, e (I) hinchamiento del labio posterior anal.....36
- Figura 4. *Steinernema* sp. cepa CP13ES. MEB. A y C, juvenil infectivo con papilas labiales en forma de “cuernos”, campo lateral y B, presencia de anastomosis. C, juvenil infectivo con terminación de la cola en punta. D, región posterior de macho de primera generación mostrando disposición de papilas caudales. E, región anterior de macho de primera generación observándose el poro excretor. F, región anterior de hembra de primera generación. F, macho de primera generación mostrando las papilas labiales y cefálicas.....37
- Figura 5. A, Vista lateral de espículas con presencia de velum. B, vista frontal de gubernáculo.....38
- Figura 6. *Steinernema* sp. CP13ES n. sp. A y B, macho de primera generación: A, región anterior y B, región posterior. C y D, macho de primera generación: C, espículas con presencia de velum, y D, Gubernáculo. E y F, juvenil infectivo: E, región anterior, y F, región posterior con terminación de la cola en punta. G, macho de segunda generación con una espina caudal al término de la

cola. H, hembra de primera generación con presencia de mucrón al término de la cola. I, hembra de segunda generación con un hinchamiento del labio posterior anal.....	40
Figura 7. Árbol filogenético construido con inferencia Bayesiana con Mr Bayes, considerando 1M de generaciones muestreadas cada 100 generaciones. El 25% de los árboles fueron descartados y la probabilidad posterior se determinó con los árboles restantes. Se usó a <i>S. nepalense</i> como especie fuera de grupo.....	47
Figura 8. Relación filogenética basado en la región 28S mediante inferencia Bayesiana. <i>Steinernema scarabei</i> fue utilizado como taxa fuera de grupo. La filogenia fue construida con Mr Bayes, considerando 1M de generaciones muestreadas cada 100 generaciones. El 25% de los árboles fueron descartados y la probabilidad posterior se determinó con los árboles restantes.....	48
Figura 9. Filogenia construida con base en la región mitocondrial 12S del grupo <i>bicornutum-ceratophorum-riobrave</i> , construido con inferencia Bayesiana con Mr Bayes, considerando 1M de generaciones muestreadas cada 100 generaciones. El 25% de los árboles fueron descartados y la probabilidad posterior se determinó con los árboles restantes. Se usó a <i>C. elegans</i> como especie fuera de grupo.....	49
Figura 10. <i>Heterorhabditis indica</i> (CP13JA). A, bursa de machos mostrando la disposición de los radios caudales. B, hinchamiento anal en la región posterior de hembras de segunda generación. C y D, juveniles infectivos: C, región anterior y, D, región posterior con terminación de la cola en punta.....	59
Figura 11. <i>Heterorhabditis indica</i> cepa CP13JA. Microscopia de luz. A, B y C, machos de segunda generación: A, región anterior, B, región posterior, C, cuerpo completo de macho de segunda generación; D, E y F, hembras de segunda generación: D, región anterior, E, región posterior, F, cuerpo	

completo de hembra de segunda generación; G, H, e I, juveniles infectivos; G, región posterior, H, región anterior, I, cuerpo completo de juveniles infectivos.....	60
Figura 12. Distribución de tratamientos de nematodos entomopatógenos contra ninfas de salivazo en una repetición del experimento de caña de azúcar. Se muestra el tamaño de parcelas y la separación entre tratamientos.....	76
Figura 13. Parcela experimental de caña de azúcar y forma de aplicación de los NEP en surcos. La parte central indica el punto de evaluación y colecta de las ninfas de salivazo.....	77
Figura 14. Prueba de medias para la infectividad en campo de <i>Steinernema</i> sp. y <i>Heterorhabditis indica</i> . Barras con misma letra indican que no existen diferencias entre sí.....	82
Figura 15. La interacción entre tratamientos en el tiempo de evaluación indica que el nematodo <i>Steinernema</i> sp., mantiene bajas las poblaciones de ninfas de salivazo y se incrementan en el testigo.....	83

## CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) se produce en diversos países del mundo. En México, hasta el 2011, se cultivaban aproximadamente 700,000 ha distribuidas en las áreas de influencia de 58 ingenios azucareros en las regiones del Pacífico, Centro, Sur y Huastecas (SIAP 2011). Veracruz es considerado el estado líder en producción a nivel nacional, al contar con 22 ingenios de los 57 con que cuenta el país. Además, por su gran diversidad agroclimática y potencial productivo, en la zafra 2014 ocupó el 34.94% de la superficie nacional sembrada, de la que se industrializaron 22,496 634 t, que originaron a su vez 2,522 967 t de azúcar, con un rendimiento de fábrica de 11.21% (CONADESUCA, 2015).

Salgado *et al.* (2003) mencionan que entre los factores que afectan el cultivo destacan numerosas plagas consideradas factores negativos para la producción de azúcar a nivel mundial y nacional. De acuerdo a su importancia económica, resaltan las siguientes: mosca pinta (*Aeneolamia* spp.) (Hemiptera: Cercopidae), rata de campo (*Sigmodon hispidus*) (Rodentia: Cricentidae), tuza (*Orthogeomys hispidus*) (Rodentia: Geomyidae) y barrenador del tallo (*Diatraea* spp) (Lepidoptera: Pyradillae). La mosca pinta o salivazo *Aeneolamia albofasciata* se considera una de las principales plagas de la caña de azúcar en México. Se estima que una población superior a 10 insectos adultos por cepa puede causar una reducción de 3 a 6 ton ha<sup>-1</sup> (Flores, 2007). A su vez, el género *Aeneolamia* es considerado una de las plagas más importantes de Centroamérica y Sudamérica, debido a que puede llegar a reducir hasta 70% los rendimientos agrícolas de las áreas infestadas (Thompson y González, 2005).

Los adultos de *A. albofasciata* y en menor grado las ninfas, causan daños severos, por las heridas que provocan al alimentarse. Específicamente introducen su estilete en los haces vasculares de las plantas, lo que en las raíces producen necrosis y en las hojas la zona afectada se torna color ocre, la cual se extiende a

lo largo del borde de las láminas foliares; esto limita la fotosíntesis y provoca la muerte del tejido (Thompson y González, 2005).

Las lesiones en el tejido foliar de caña de azúcar ocasionan una disminución en el área disponible para la fotosíntesis y la productividad de la caña. Para la reducción de daños por este insecto, se ha desarrollado un programa de manejo integrado, dirigido al control de los adultos.

Las ninfas se recubren de saliva, un mucopolisacárido secretado por los tubos de Malpigio, material que les permite evitar la desecación y evadir el ataque de enemigos naturales. Esta barrera que ofrecen las ninfas, les ayuda evitar la penetración de otros agentes biológicos, y se considera que puede ser superada por los nematodos entomopatógenos de las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae. Estos nematodos presentan atributos que los hacen idóneos para el control de ninfas; los cuales son habitantes del suelo y están adaptados a condiciones diversas, así como presentar capacidad para acechar o buscar el insecto hospedero, y poderlo para matar en 48 a 72 h (Kaya 1990; Kaya y Koppenhöfer, 1996; Akhurst y Smith, 2002). Por lo tanto el presente trabajo se orientó a la búsqueda de aislamientos nativos, su identificación y evaluación como agentes biológicos de la mosca pinta.

## CAPÍTULO 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Mosca Pinta o Salivazo (Hemiptera: Cercopidae)

El cultivo de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) se ve afectado por la presencia de diversos problemas fitosanitarios; que incluye el daño ocasionado por el salivazo o mosca pinta. Esta familia comprende aproximadamente 3000 especies fitófagas, e incluye algunas de importancia económica (Cryan y Svenson, 2010). La mosca pinta presenta una amplia distribución geográfica, que va desde el sureste de los Estados Unidos de América hasta el noreste de Argentina, con una distribución altitudinal entre 0 a los 3000 msnm (metros sobre el nivel del mar) (Peck, 2001). Los géneros *Aeneolamia* spp. (Fennah, 1949) y *Prosapia* spp. (Fennah, 1949), son abundantes y representativos de las zonas de abastecimiento de los ingenios comprendidos en la vertiente del Golfo de México. Esta plaga es considerada uno de los principales problemas fitosanitarios de la caña de azúcar y de pastos en México, ya que se encuentra presente en cerca del 60% de los ingenios existentes en el país (CONADESUCA, 2011), entre los que destacan los ubicados en los estados de Tamaulipas, San Luis Potosí, Veracruz, Oaxaca, Tabasco, Chiapas y Quintana Roo (Flores, 1994; Enríquez *et al.*, 1999).

Las ninfas de los géneros *Aeneolamia albofaciata* (Lallemand) *A. contigua* (Walker) y *Prosapia simulans* (Walker) se alimentan de las raíces, mientras que el estado adulto perjudica las partes aéreas de la planta al chupar la savia de tallos y hojas, a la vez que inyecta toxinas y ocasiona reducción en la producción de azúcar (García-García *et al.*, 2006). Las ninfas son conocidas como salivazos porque secretan una especie de saliva, la cual es utilizada como recubrimiento y protección contra los enemigos naturales, ofreciéndoles también un microclima favorable para su desarrollo (Calderón *et al.*, 1982). Los adultos son de vida libre, se les considera malos voladores, ya que se desplazan principalmente mediante saltos o a través de las corrientes de viento; donde no hay reportes de que puedan desplazarse grandes distancias (Coronado, 1978).

## 2.2 Situación Taxonómica

La familia Cercopidae presenta cerca de 1400 especies clasificadas en dos subfamilias, 17 tribus y 142 géneros. Sin embargo, se considera que el número de especies puede ser mucho mayor (Cryan y Svenson, 2010). Varias especies están distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales (Paladini y Cavichioli, 2015).

Las pobres descripciones taxonómicas, la presencia de polimorfismo en ciertas especies (Cryan y Svenson, 2010; Calderón *et al.*, 1982) y la inaccesibilidad a los tipos de las especies depositadas en museos, no han permitido comparar los patrones de coloración y genitalia (Carvalho y Webb, 2004), lo que ha contribuido al poco avance en el reconocimiento de las especies de este grupo. La plasticidad de algunas especies, es un indicativo de que podrían pertenecer a una misma especie polimórfica, mientras que otras muy similares, podrían pertenecer a diferentes especies o a diferentes géneros (Thompson y González, 2005).

Así mismo, hace falta la elaboración de claves adecuadas y completas que ofrezcan la posibilidad de identificar fácilmente y de manera accesible las especies de mayor importancia (Carvalho y Webb, 2005). Para la identificación de los géneros neotropicales de Cercopidae, los caracteres diagnósticos se han basado en la morfología de la cabeza y el pronoto, así como en el número de espinas de las patas traseras (Paladini y Cavichioli, 2015). Sin embargo para los géneros *Aeneolamia* y *Prosapia*, las características morfológicas se basan principalmente en la coloración de las bandas transversales, en el pronoto y las tegminas (Clark *et al.*, 1976). Estas diferencias en el abordaje de las claves han generado confusión, y complican su correcta identificación (Thompson y González, 2005). Varias subespecies se han agrupado inadecuadamente, con autenticidad incierta (Riess y Cáceres, 1976). Hoy se considera importante la combinación de descripciones morfológicas, así como el uso de herramientas moleculares para un esclarecimiento adecuado de las especies (Castro *et al.*, 2007). La ayuda de taxónomos calificados para la incorporación de observaciones detalladas de las



características en la genitalia de ambos sexos, sería definitorio en la separación de las variaciones presentes en estos géneros (Fennah 1953).

### 2.3 Ciclo de Vida

Los cercópidos, como otros miembros del orden Hemiptera son hemimetábolos, por lo que no cuentan con estadios larvales y de pupa, donde el huevo fértil, al eclosionar da origen a una ninfa (Calderón *et al.*, 1982). En contraste con los salivazos univoltinos (una generación por año) de climas templados, los salivazos de climas tropicales, son en su mayoría multivoltinos. Su ciclo de vida está ligado a las precipitaciones estacionales (Carvalho y Webb, 2005), siempre y cuando el inicio de las lluvias y el incremento de temperatura les sean favorables (Fontes *et al.*, 1995). Estas condiciones marcan la pauta para que se inicie el desarrollo y crecimiento embriológico de los huevos invernantes o diapausicos. La eclosión de los huevos ocurre cuando se acumulan 45 a 60mm de lluvias durante el verano (Martin *et al.*, 1995). Los géneros de mosca pinta presentes en el estado de Veracruz, desarrollan regularmente dos a tres generaciones por año, alcanzando hasta cuatro generaciones, ya que el ciclo completo transcurre en 40 a 65 días, a temperaturas entre 25.8 y 28.1°C (García-García *et al.*, 2006). En países como Colombia, la especie *A. reducta* (Lallemand, 1924) puede presentar hasta seis generaciones por año (Carvalho y Webb, 2005; Castro *et al.*, 2005). Generalmente los adultos machos llegan al cultivo un día antes que las hembras, ya que es una especie protándrica, es decir, los machos completan su desarrollo más temprano (Peck *et al.*, 2014).

Las ninfas de *A. contigua* emergen de huevos depositados en el suelo a 1 ó 2 cm de profundidad y permanecen muy cerca de las raíces de la caña de azúcar (Thompson y González, 2005). Las especies autóctonas de Veracruz, como *A. contigua* (Walter, 1851), *A. albofasciata* (Lallemand, 1939) y *Prosapia* spp., presentan comportamientos similares, ya que depositan sus huevos en los

estolones, sobre la superficie del suelo o en los residuos vegetales (Thompson y González, 2005).

Morfológicamente, los huevos son alargados u ovales, con una longitud promedio de 1 mm y un diámetro de 0.3 mm. Su coloración es amarillo crema, la cual se torna más intensa al avanzar la maduración, hasta tomar una coloración rojiza o naranja antes de su eclosión (Calderón *et al.*, 1982). Las ninfas emergen de los huevos a los 12 a 18 días, cuando la humedad relativa se encuentra entre 80 a 90%. En condiciones de humedad relativa baja, los huevos entran en diapausa (Thompson y González, 2005). Al emerger, las ninfas buscan refugio de inmediato en los sitios húmedos y sombreados de las plantas y comienzan a alimentarse, lo que da inicio al desarrollo de varios estadios de desarrollo (Calderón *et al.*, 1982).

Los cinco estadios ninfales tienen una duración de 40 a 50 días en condiciones favorables. La ninfa se recubre con espuma de consistencia mucilaginosa, secretada por las glándulas de Batelli, que se deriva del exceso de líquido que extraen del xilema al alimentarse y de mucopolisacáridos (Thompson y González, 2005). En el último estadio, la espuma que recubre a la ninfa se vuelve más densa y dura varios días, hasta que ocurre la última muda. En esta fase las ninfas desarrollan progresivamente las estructuras alares y reproductivas hasta la emergencia del adulto (Thompson y González, 2005). Inicialmente, los adultos son de color blanco y permanecen inmóviles durante varias horas. Al contacto con el aire, el cuerpo y las alas van adquiriendo lentamente una coloración oscura, por la oxidación de sus pigmentos. Posteriormente las tegminas adquieren bandas transversales de color claro o anaranjado, que permite diferenciarlas fácilmente a nivel de género (Calderón *et al.*, 1982).

### 2.3.1 Género *Aeneolamia* spp. Fennah (1949)

Los adultos miden de 8 a 9 mm de longitud. La región cefálica se caracteriza por la presencia de una frente convexa sobresaliente, con dos pequeños ocelos en

medio de los ojos compuestos que son más protuberantes. Las antenas son cortas y setáceas, con dos segmentos basales cortos y el resto filiforme. El pronoto es relativamente grande, de forma hexagonal o trapezoidal (Calderón *et al.*, 1982). Las alas posteriores son transparentes y membranosas, mientras que las alas anteriores presentan las líneas o bandas transversales de una coloración rojiza a naranja para *A. contigua* (Walker) y con líneas beige, y en algunos casos una línea oscura transversal con el fondo de las alas en una tonalidad blanquecina para *A. albofasciata* (Lallemand) (Fig. 1). Se considera que esta última especie presenta una alta variación fenotípica en la coloración de las alas, así como en el tamaño de los individuos (Alatorre-Rosas *et al.*, 2013).

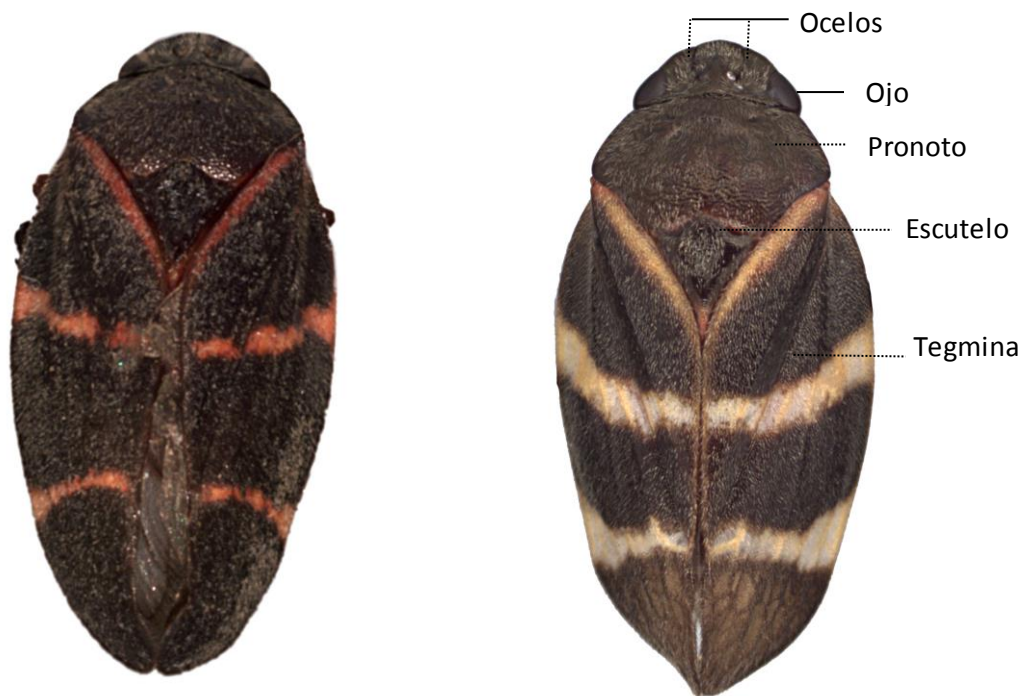


Figura 1. *Aeneolamia contigua* (izquierda) y *Aeneolamia albofasciata* (derecha); muestran la coloración característica de las alas.

### 2.3.2 Género *Prosapia* spp. Fennah (1953)

Los adultos de *P. simulans* (W.) miden 10 mm (Calderón *et al.*, 1982) y se caracterizan por tener tegminas de 5-8 mm. Las hembras cuentan con líneas en las alas cremoso-amarillento, mientras que los machos regularmente presentan tegminas oscuras (Fennah, 1953, Hamilton 1997). Sin embargo, individuos de ambos sexos pueden presentar bandeos en las alas, mientras que otros son oscuros con bandeos tenues o sin bandas (Thompson y González, 2005) (Fig. 2). La cabeza, el pronoto, el escutelo así como las alas son de color negro; el pronoto es cruzado por una banda transversal y las alas están cruzadas por dos bandas transversales que son de color amarillo o en algunos casos son de una tonalidad anaranjada, las cuales pueden ser anchas o estrechas y presentarse como completas o incompletas. En el caso de las hembras, los bandeos en las alas pueden estar reducidos o ausentes, presentar una coloración más oscura en el cuerpo (Castro *et al.*, 2007), con un postclípeo no ensanchado distalmente (Fennah, 1953).



Figura 2. *Prosapia simulans*; mostrando dos diferentes tipos de coloración en los bandeos de las alas. Pronoto con banda brillante o tenue, característica del género.

## 2.4 Daño en los Cultivos

Los cercópidos neotropicales son conocidos por el daño que causan a los pastos de forrajeo y por alimentarse directamente en las plantas de caña de azúcar (Carvalho y Webb, 2005; Holmann y Peck, 2002; Cruz *et al.*, 2009). Los géneros de mayor importancia económica para los cultivos de caña de azúcar y pasturas en varios países de América Latina son *Zulia*, *Deois*, *Prosapia*, *Aeneolamia* y *Mahanarva* (Carvalho y Webb, 2005; Thompson y León González, 2005). La picadura de las ninfas en las raíces y la parte baja del tallo alcanza los haces vasculares y causa su deterioro, lo cual restringe o impide el paso del agua y los nutrimentos a las partes aéreas de la planta. Los daños causados por adultos provocan el secamiento del follaje; inyectan toxinas que ocasionan la disolución del parénquima foliar (Calderón *et al.*, 1982), lo que provoca un amarillamiento en el 70% de las hojas dañadas (Cruz *et al.*, 2009; Carvalho y Webb, 2005; Valério y Nakano 1998). Cuando el ataque por altas infestaciones es severo, se presentan lesiones necróticas que se extienden longitudinalmente hacia el ápice, lo que ocasiona la marchitez y muerte de la hoja (Valério *et al.*, 2001), y finalmente de toda la planta (Taliaferro *et al.*, 1967; Calderón *et al.*, 1982; Moreno-Salguero *et al.*, 2012). Los daños provocan pérdidas significativas en la calidad de la caña y se ven reflejados durante la cosecha en el contenido de la sacarosa, la reducción total de azúcares, con cambios en el pH durante el proceso de fermentación y reducción en el contenido de etanol (Ravaneli *et al.*, 2011). Estos se presentan desde el sureste de los EE.UU. hasta el sur de Brasil, con reducciones estimadas de hasta 70% y pérdidas monetarias por 840 a 2100 millones de dólares anuales (Thompson, 2004).

Las especies que atacan pastos causan serias pérdidas económicas a la industria ganadera (Castro *et al.*, 2007; Holmann y Peck, 2002). Altas poblaciones de esta plaga inhiben el establecimiento y la persistencia de pasturas, lo que incrementa la degradación del suelo (Carvalho y Webb, 2005; Valério *et al.*, 2001), con serias pérdidas en millones de hectáreas de pastos utilizados como alimento para el

ganado (Valério *et al.*, 2001), lo que provoca una baja en la producción de leche y carne (Valério y Nacano, 1988; Holmann y Peck, 2002).

La emergencia de los salivazo está sincronizada con el inicio de los primeros brotes de pasto *Brachiaria* sp. ó de caña de azúcar (Peck *et al.*, 2014). Las altas infestaciones de la plaga dentro del cultivo presentan síntomas similares a los causados por severas restricciones de agua, como son la reducción del crecimiento del tallo y la marchitez de las plantas (Rossini-Guimaraes *et al.*, 2008).

Los estudios enfocados en la determinación del número máximo de generaciones que puede alcanzar esta plaga dependerá de la región, época e intensidad del periodo de lluvias y la magnitud del daño que causen (Castro *et al.*, 2005); así como de la supervivencia de los huevos diapásicos de cada especie, durante los periodos secos (Peck *et al.*, 2014).

Se requiere establecer la ubicación de los sitios estacionales, ya que durante el inicio de la estación húmeda, se origina la eclosión sincrónica de la plaga, la cual daña los primeros brotes del cultivo de principio de temporada. Esta dinámica se caracteriza por presentar altas fluctuaciones de poblaciones sincrónicas. Sin embargo, cuando la humedad es continua, todas las etapas de desarrollo de la plaga se encuentran presentes, donde las fluctuaciones y la sincronía se reducen ampliamente, afectando el rendimiento en el hospedero (Carvalho y Webb, 2005). Por ejemplo en el hemisferio sur, las primeras lluvias propician la emergencia de los adultos de *A. varia* después de 27 a 34 días en el mes de mayo, aunque no hay una perfecta sincronía de la emergencia de ninfas con las primeras lluvias (King, 1975). No obstante, cuando una generación reduce los sitios de alimentación, futuras generaciones del insecto pueden migrar a otros nichos de alimentación cuando se enfrentan a una baja calidad nutricional del hospedero o del sitio (Fontes *et al.*, 1995). Así, los estudios de fluctuaciones estacionales de ninfas permiten establecer las diferentes generaciones del insecto y un mejor control de la plaga (Peck *et al.*, 2014).

## 2.5 Control de la Mosca Pinta

Los esfuerzos para realizar un adecuado control de la mosca pinta deben estar dirigidos a conocer la duración del ciclo de vida, la diapausa del huevo y los sitios de ovoposición. Esto permite construir modelos más precisos para controlar los primeros brotes del insecto, y disminuir la dispersión de posteriores generaciones a nuevas áreas (Peck *et al.*, 2002). Por ello, es indispensable conocer las medidas de control y el momento más oportuno para aplicarlas. Cuando se registra la captura de 50 adultos/semana/trampa pegajosa amarilla en condiciones de campo, o se ha dado el avistamiento de 0.2 ninfas/tallo o 0.2 adultos/tallo, es indicativo de iniciar medidas de control en el Valle del Cauca (Gómez, 2007).

La información sobre la fluctuación de poblaciones y la fenología del salivazo, sirven para la predicción espacial y temporal de los primeros brotes de la plaga. Con ello se pueden desarrollar tácticas de manejo que supriman los brotes iniciales, así como la disminución de la dispersión de posteriores generaciones a nuevas áreas (Peck *et al.*, 2014).

### 2.5.1 Control químico

Se han utilizado varios plaguicidas para combatir a la mosca pinta imidacloprid, thiametoxam, malatión, entre otros. Sin embargo, resulta de mayor provecho el conocimiento adecuado de cada uno de los productos, su efecto residual, su persistencia en el ambiente, la búsqueda de productos con baja toxicidad, con selectividad a enemigos naturales y el momento oportuno de su aplicación (Calderón *et al.*, 1982).

Los métodos de control químico son por lo general evitados, debido a los efectos drásticos que ocasiona en México y a nivel mundial. Especialmente los daños en las poblaciones de la fauna benéfica, con una perturbación general en el equilibrio ecológico. Además, los ingredientes activos permanecen en el ambiente por largos periodos de tiempo después de haber sido aplicados (Calderón *et al.*, 1982). Se ha comprobado que el uso de plaguicidas reduce significativamente la presencia de



parasitoides y depredadores naturales en el cultivo (Valério *et al.*, 2001). A pesar de estos efectos negativos, los insecticidas químicos son la principal estrategia de control implementada cuando las poblaciones y el daño han alcanzado niveles alarmantes. Como ejemplo, Riess y Cáceres (1976) reportaron que se han realizado aspersiones con avión en dosis de 1.5 kg ha<sup>-1</sup> de carbaril al 80% disuelto en 60 L de agua. Tras los primeros brotes de adultos en campo, se ha aplicado malatión emulsificable al 50% en dosis de 1 L ha<sup>-1</sup>. Se realizaron aplicaciones con imidacloprid a partir de 2.5 insectos por m<sup>2</sup> de *Mahanarva fimbriolata*, y thiametoxam con 3.2 insectos por m<sup>2</sup>; lo que permitió reducir pérdidas del cultivo durante la cosecha (Dinardo-Miranda *et al.*, 2012).

### 2.5.2 Control cultural

El control cultural comprende todas las prácticas agronómicas que tienen por objeto proporcionarle a las plantas las condiciones favorables para su desarrollo y a su vez crear un ambiente menos favorable para el insecto plaga (Calderón *et al.*, 1982). Está fundamentado en el conocimiento de las poblaciones de la mosca pinta como insecto plaga. Por lo que después del proceso de detección y cuantificación de huevos de esta plaga en el suelo, se recomiendan las rastras mecanizadas sobre el cultivo, con lo que se logra reducir la presencia de huevos tras la exposición directa al sol (Gómez, 2007; Márquez *et al.* 2009).

### 2.5.3 Resistencia varietal

Entre los esfuerzos empleados para el control de la mosca pinta se ha considerado el desarrollo de la resistencia varietal (Valério *et al.*, 2001). Por ejemplo varios estudios han demostrado que tras la selección de diversas variedades de plantas contra esta plaga, se puede llegar a una disminución en el daño ocasionado (Cuarán *et al.*, 2012; Parsa *et al.*, 2011). García y colaboradores (2011) lograron identificar las variedades de caña menos favorables para el



desarrollo de ninfas de *M. fimbriolata*, así como para la ovoposición y longevidad de los adultos.

Entre los mecanismos de resistencia de las plantas se incluyen la antixenosis, mecanismos por el cual la planta evita ser seleccionada por el insecto plaga (no preferencia, estimada por el grado de colonización). La antibiosis, en el cual los mecanismos de la planta afectan el grado de alimentación del herbívoro, estimando por el grado de colonización (Dinardo-Miranda *et al.*, 2016); y la tolerancia, que permite a la planta resistir el daño causado por la plaga sin perder su calidad (Parsa *et al.*, 2011). La antibiosis ha sido estudiada como una vía prometedora para plantas del género *Brachiaria* spp., que ha permitido seleccionar distintas variedades con niveles de daño bajos o ausentes (Sotelo *et al.*, 2008).

Las evaluaciones realizadas por Cardona y colaboradores (2004), dirigidas hacia la expresión de mecanismos de antibiosis y tolerancia en 65 clones híbridos de pastos del género *Brachiaria* sp. sobre cinco especies de mosca pinta, revelaron que 15 de ellas presentaban tolerancia y tres resistencia por antibiosis en condiciones de campo. En otras investigaciones se ha observado que se requieren 8 ninfas de *Z. carbonaria* para causar severos daños en las plantas de 12 semanas de edad en las variedades CC 85-92 y CC 84-75 (Cuarán *et al.*, 2012). Por ello, el monitoreo sobre la presencia de adultos en el cultivo, en relación al nivel de daño económico y los mecanismos de resistencia de las plantas, ayudan a un manejo adecuado y oportuno de la plaga (Thompson y González, 2005).

#### 2.5.4 Control biológico

Se han reportado diversos enemigos naturales asociados a las diferentes especies de salivazo. Entre ellos destacan los microhimenópteros que parasitan huevos, así como varios hongos parasíticos, arácnidos y algunos vertebrados (lagartijas) que son depredadores de ninfas o adultos (Calderón *et al.*, 1982).

Se considera un reto el encontrar nuevos organismos benéficos contra el salivazo, que puedan ser incorporados en programa de manejo integrado. La selección o

combinación de los organismos más prometedores, su correcta aplicación y el momento más adecuado, favorece la efectividad del control biológico en condiciones de campo (Dinardo-Miranda, 2003; Peck *et al.*, 2002).

#### 2.5.4.1 Parasitoides y depredadores

Castro y colaboradores (2005) utilizaron al díptero *Salpingogaster nigra* (Dipera: Syrphidae) para controlar ninfas de *Z. carbonaria* en pasturas. Es considerado un agente potencial para el control biológico de la mosca pinta, ya que en su estado larval se alimentan vorazmente de las ninfas de la plaga (Lastra *et al.*, 2007).

Castro y colaboradores (2005) implementaron el uso de ácaros (Acari: Erythraeidae) ectoparásitos de adultos de *Z. carbonaria* en pasturas. Coronado (1978) reportó el uso de ácaros y arañas, sin identificar, para el control de adultos de mosca pinta. Carvalho y Webb (2005) emplearon parasitoides de las familias Eulophidae, Mymaridae y Trichogrammatidae; así como dípteros de la familia Tachinidae y Asilidae para el control de huevos y ninfas.

#### 2.5.4.2 Entomopatógenos

En la última década se ha implementado el uso de agentes microbianos contra la mosca pinta. El hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Castillo 2006; Obando *et al.*, 2013; Samuels *et al.* 1989) se ha usado para el control de ninfas de *Mahanarva fimbriolata* (Stal.) (Tiago *et al.*, 2011). Con las aplicaciones de estos organismos, se busca principalmente un establecimiento a largo plazo, así como una adaptación dentro del cultivo (Valério *et al.*, 2001). En condiciones de campo, se ha observado la presencia de los hongos *Aspergillus* sp. y *Fusarium* sp., infectando huevos de *Z. carbonaria* (Calderón *et al.*, 1982). También se han obtenido a los hongos *Curvularia* sp., *Paecilomyces crustaceus*, *P. lilacinus* y *Penicillium* sp., de cadáveres de la mosca pinta (Castro *et al.*, 2005).

El uso del hongo *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota; Hypocreales) despertó interés en diversos países para el control de especies de mosca pinta. A partir de 1970 a la fecha, existen importantes contribuciones en el desarrollo de este agente como micoinsecticida para el control de adultos (Alatorre-Rosas y Hernández-Rosas. 2015). Sin embargo a pesar de los resultados exitosos obtenidos, en algunos casos la baja efectividad de las aplicaciones con *Metarhizium* spp. para tratar de controlar altas infestaciones, ha desalentado su uso en el control de la mosca pinta (Tiago *et al.*, 2011). Por ello, se considera necesario buscar nuevos aislamientos o nuevos microorganismos con potencial para la regulación de poblaciones, tanto de ninfas como de adultos de la mosca pinta, que mantengan una elevada virulencia (Obando *et al.*, 2013).

En el caso particular de los nematodos entomopatógenos, se han encontrado parasitando de manera natural ninfas de *A. varia*, con *Hexameris dactylocercus* (Nematoda: Mermithidae) (Poinar Jr. y Linares, 1985), *Steinernema* spp. (Hernández-Rosas *et al.*, 2009) y *Heterorhabditis* spp. (Ferrer *et al.*, 2004; Calderón *et al.*, 1982). Se ha estudiado su capacidad para buscar, invadir y matar a las ninfas de la mosca pinta y se considera prometedora (Ferrer *et al.*, 2004; Leite *et al.*, 2005; De Paula Batista y Machado Auad 2010). Las investigaciones realizadas sobre ninfas de *A. varia* demostraron que nematodos del género *Heterorhabditis* son más virulentos que los del género *Steinernema* (Moreno-Salguero *et al.*, 2012). Sin embargo se necesitan estudios adicionales para determinar las condiciones favorables para su establecimiento y mayor efectividad en el control de la mosca pinta (Obando *et al.*, 2013).

#### 2.5.4.2.1 Ciclo de vida de *Steinernema* spp. y *Heterorhabditis* spp.

Los nematodos correspondientes a los géneros *Steinernema* Travassos y *Heterorhabditis* Poinar son considerados parásitos de insectos, viven parte de sus vidas en la hemolinfa del insecto hospedero (Dunphy y Webster, 1987; Poinar 1990). Estos nematodos se caracterizan por mantener una relación mutualista con

bacterias Gram-negativas de la familia Enterobacteriaceae. El género *Xenorhabdus* Poinar y Thomas (1965) está asociado con nematodos de la familia Steinernematidae, mientras que el género *Photorhabdus* Boemare (1993) se vincula con nematodos de la familia Heterorhabditidae. En ambos casos las bacterias simbiotas son albergadas en el intestino de los juveniles infectivos (JI), los cuales representan el único estadio libre en su ciclo de vida. La asociación de la bacteria simbiota y NEP es considerada patogénica para un amplio rango de insectos plaga (Burnell y Stock, 1999). Una vez que los JI localizan un insecto hospedero, lo penetran por diferentes vías y migran hacia su hemocele, donde liberan las bacterias simbiotas. Estas bacterias son las responsables de la muerte del insecto. Específicamente, inhiben el sistema inmune del insecto, causan una septicemia masiva, y producen toxinas que matan rápidamente al mismo. A su vez, estos compuestos secundarios licuan los tejidos del insecto para facilitar ser digeridos por los nematodos (Bai et al., 2013). En estas condiciones los nematodos reanudan su desarrollo maduran y se reproducen (Stock y Goodrich, 2008). Los metabolitos secundarios también tienen actividad antibiótica y ayudan a minimizar la competencia por otros organismos (Hu y Webster, 2000). Por lo general tienen dos generaciones de adultos, donde al final la progenie se transforma en JI cuando la disponibilidad de alimento y espacio es reducida. Justo antes de la salida del hospedero, las bacterias simbiotas colonizan y se desarrollan dentro del intestino de los juveniles, sin llegar a ser digeridas por ellos. Los juveniles del segundo estadio se transforman en juveniles infectivos (equivalente al 3er estado juvenil o J3). Estos JI se caracterizan por poseer el ano y la boca obturados, así como poseer una doble cutícula que les permite sobrevivir a las condiciones ambientales e ir en búsqueda de otro insecto susceptible (Martens et al., 2003). Al invadir un nuevo hospedero, transmite nuevamente la bacteria simbiótica y repite dentro de él su ciclo de vida (Ciche et al., 2006).

*Steinernema* y *Heterorhabditis* pueden sobrevivir en ausencia de su hospedero, lo que depende de factores como la temperatura, humedad, enemigos naturales, tipo de suelo y de la especie de nematodo. *S. carpocapsae* y *S. glaseri* sobreviven mejor en suelo arcillo-arenoso con baja humedad relativa (2 a 4%) (Kung y Kaya

1991). Las formas infectivas de *S. scapterisci* sobreviven durante 13 semanas en suelo arenoso y arenoso arcilloso en el punto en que ocurre la marchitez de las plantas, demostrando con esto que los niveles de humedad no constituyen un factor crítico para la sobrevivencia de estas especies, considerando que entran en un estado anhidrobiótico (Smart, 1994).

Si se desea explotar a los nematodos como agentes de control biológico de insectos en el suelo, necesitamos entender sus interacciones en este ambiente. Este conocimiento constituirá la base para estudios futuros sobre la dinámica poblacional, permitiendo optimizar el potencial de los nematodos en el control de insectos del suelo. Uno de los factores clave en el funcionamiento de estos nematodos es la correcta aplicación, ya que pueden ser aplicados con cualquier equipo convencional de uso agrícola (Martin y Miller, 1995).

## 2.6 Literatura Citada

- Akhurst, R., and K. Smith. 2002. Regulation and Safety. In: R. Gaugler (ed.) Entomopathogenic Nematology. CAB International 2002. pp. 311-326.
- Alatorre-Rosas, R., M. G. Carrillo-Benítez, P. F. Grifaldo-Alcántara, J. Valdez-Carrasco, A. W. Guzmán-Franco, J. Romero-Nápoles, O. Segura-León, F. Hernández-Rosas, J. López-Collado, y J. A. Villanueva-Jiménez. 2013. Proyecto Nacional "Diseño de un Programa Contemporáneo de Manejo Integrado de Mosca Pinta en Caña de Azúcar" FMP-002. <https://sites.google.com/site/moscapinta/>
- Alatorre-Rosas, R., y F. Hernández-Rosas. 2015. Mosca pinta, *Aeneolamia* spp. y *Prosapia* spp. (Hemiptera: Cercopidae). In: Hugo Cesar Arredondo Bernal y Luis Ángel Rodríguez del Bosque (eds.): Casos de Control Biológico en México. Vol 2. pp. 141-164.

- Bai X, B. J. Adams, T. A. Ciche, S. Clifton, R. Gaugler, K. S. Kim, J. Spieth, P. W. Stenberg, R. K. Wilson, and P. S. Grewal. 2013. A lover and a fighter: The genome sequence of an entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. PLoS ONE 8: e69618. doi:10.1371/journal.pone.0069618.
- Burnell, A. M., and S. P. Stock. 1999. *Heterorhabditis*, *Steinernema* and their bacterial symbionts - lethal pathogens of insects. Nematology 2000. (2): 31-42.
- Calderón M., G. Arango, A. Varela, A. Fernán, G. Valencia, y A. Carlos. 1982. Cercópodos plaga de los pastos en América Tropical. Biología y control. Serie 04SP-03.02 CIAT. Cali, Colombia.
- Cardona, C., P. Fory, G. Sotelo, A. Pabon, G. Díaz, and J. W. Miles. 2004. Antibiosis and tolerance to five species of spittlebug (Homoptera: Cercopidae) in *Brachiaria* spp.: Implications for breeding for resistance. Journal of Economical Entomology 97: 635-645.
- Carvalho S. G., and D. M. Webb. 2004. A new genus and nine new species of Neotropical spittlebugs (Hemiptera: Cercopidae, Tomaspinidae). Revista Brasileira de Entomologia 48: 383-389.
- Carvalho S. G., and D. M. Webb. 2005. Cercopid spittle bugs of the new world (Hemiptera, Auchenorrhyncha, Cercopidae). Pensoft publishers. ISBN 954-642-246-0.
- Castro, U., Morales, A. y Peck, D.C. 2005. Dinámica poblacional y fenología del salivazo de los pastos *Zulia carbonaria* (Lallemand) (Homoptera: Cercopidae) en el Valle Geográfico del Río Cauca, Colombia. Neotropical Entomology 34:459-470.
- Castro, U., C. Cardona, J. Vera-Graciano, J. Miles, y R. Garza-García. 2007. Identificación morfológica y molecular de *Prosapia simulans* (Walker) (Hemiptera: Cercopidae), y selección y mecanismos de resistencia a este salivazo en híbridos de *Brachiaria*. Neotropical Entomology 36:547-554.
- Castillo Z. S. 2006. Uso de *Metarhizium anisopliae* para el control biológico del salivazo (*Aeneolamia* spp. y *Prosapia* spp.) en pastizales de *Brachiaria*

*decumbens* en El Petén, Guatemala. Tesis Magister Scientiae en Agricultura Ecológica. Turrialba, Costa Rica. 67.

Ciche, T. A., C. Darby, R. U. Ehlers, S. Forst, and H. G. Blair. 2006. Dangerous liaisons: The symbiosis of entomopathogenic nematodes and bacteria. *Biological Control* 38: 22–46.

Clark, W. E., G. E. Ibarra Díaz, and H. W. Van Cleave. 1976. Taxonomy and biology of spittlebugs of the genera *Aeneolamia* Fennah and *Prosapia* Fennah (Cercopidae) in Northeastern Mexico. *Folia Entomológica Mexicana*, 34: 13-24.

Coronado Padilla, R. 1978. Memoria de la campaña contra la mosca pinta. Coyoacán, México. Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH). 126p.

CONADESUCA. 2011. Diagnóstico del Campo Cañero, Capítulo: Plagas y Enfermedades. Estado de atención en los ingenios.

CONADESUCA. 2015. Comité Nacional para el Desarrollo Sustentable de la Caña de Azúcar. <http://www.conadesuca.gob.mx/index.html>. Consultado: 2 de febrero de 2015.

Cruz, I., I. F. Da Silva, S. C. Paula, M. I. C. Figueiredo, M. M. G. Neto, and R. B. Da Silva. 2009. Damage of the spittlebug *Deois flavopicta* (Stal) (Hemiptera: Cercopidae) to maize in intercropping system with *Brachiaria* grass. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo* 8: 117-130.

Cryan, J.R. and G. J. Svenson. 2010. Family-level relationships of the spittlebugs and froghoppers (Hemiptera: Cicadomorpha: Cercopoidea). *Systematic Entomology*, 35: 393-415.

Cuarán, V. L., U. V. Castro, A. E. Bustillo-Pardey, N. C. Mesa-Cobo, G. D. Ramírez-Sánchez, C. A. Moreno-Gil, y L. A. Gómez-Laverde. 2012. Método para evaluar el daño de los salivazos (Hemiptera: Cercopidae) sobre caña de azúcar, *Saccharum* spp. *Revista Colombiana de Entomología*. 38: 171-176.

- De Paula Batista, E. S., and A. Machado Auad. 2010. Application methods of entomopathogenic nematodes for control of *Mahanarva spectabilis* (Hemiptera: Cercopidae) *Biocontrol Science and Technology*, 20: 1079-1085.
- Dinardo-Miranda, L. L. 2003. Cigarrinha das raízes em cana de-açúcar. Campinas: Instituto Agronômico, 72p.
- Dinardo-Miranda, L. L., J. P. Pivetta, and J. Vilela-Fracasso. 2012. Economic injury level for sugarcane caused by the spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Stal) (Hemiptera: Cercopidae). *Scientia Agricola* (Piracicaba, Braz.), 65: 16-24.
- Dinardo-Miranda, L. L., J. Vilela Fracasso, M. C. de O. Dilermando Perecin, D. O. Peixoto Lopes, T. Sabongi Izeppi, I. A. dos Anjos. 2016 Resistance mechanisms of sugarcane cultivars to spittlebug *Mahanarva fimbriolata*. *Scientia Agricola*, 73: 115-124
- Dunphy, G. B., and J. M. Webster. 1987. Partially characterized components of the epicuticle of dauer juvenile *Steinernema feltiae* and their influence on hemocyte activity in *Galleria mellonella*. *Journal of Parasitology*, 73: 584-588.
- Enríquez, Q. J. F., N. F. Meléndez y A. E. D. Bolaños. 1999. Tecnología para la Producción y Manejo de Forrajes Tropicales en México. INIFAP. CIRGOC. Campo Experimental Papaloapan. Libro Técnico No. 7. Veracruz, México. 262p.
- Fennah, R.G. 1953. Revisionary notes on neotropical Monecphorine Cercopoidea (Homoptera). *Annals and Magazine of Natural History*, London, 12: 337-360.
- Flores C., S. 1994. Las Plagas de la Caña de Azúcar en México. Ed. Silverio Flores Cáceres, México, D.F., 350 p.
- Flores C., S. 2007. Las Plagas de la Caña de Azúcar en México. Segunda Edición. México. D.F. 288 p.
- Ferrer, F., M. Arias, A. Trelles, G. Palencia, J. M. Navarro, y R. Colmenares. 2004. Posibilidades del uso de nematodos entomopatógenos para el control de *Aeneolamia varia* en caña de azúcar. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología* (Costa Rica), 72: 39-43.



- Fontes, E. G., C. S. Pires, and E. R. Suji. 1995. Mixed risk spreading strategies and the population dynamics of a Brazilian pasture pest, *Deois flavopicta* (Homoptera: Cercopidae). *Journal of Economical Entomology*, 88: 1256-1262.
- García-García, C., J. López-Collado, M. E. Nava-Tablada, J. A. Villanueva-Jiménez y J. Vera-Graziano. 2006. Modelo de Predicción de Riesgo de Daño de la Mosca Pinta *Aeneolamia postica* (Walker) Fennah (Hemiptera: Cercopidae). *Neotropical Entomology* 35: 677-688.
- Gómez L., L. A. 2007. Manejo del salivazo *Aeneolamia varia* en cultivos de caña de azúcar en el Valle del río Cauca. Informe Especial, Carta Trimestral CENICAÑA 2 y 3: 10-17.
- García, J., S. S. Prado, J. D. Vendramim, and P. S. M. Botelho. 2011. Effect of sugarcane varieties on the development of *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera: Cercopidae). *Revista Colombiana de Entomología* 37: 16-20.
- Hamilton, K. G. A. 1997. Review of the world species of *Prosapia* Fennah (Rhynchota: Homoptera: Cercopidae). *Canadian Entomologist* 109: 621-630.
- Hernández-Rosas F, N. Real-Luna y J. Ortiz–Martínez. 2009. Entomopatógenos asociados a la rizósfera de la caña de azúcar con incidencia de mosca pinta, pp. 246- 249. *In*: Zapata-Mata R., W. M. Contreras-Sánchez, A. A. Granados Berber, y S. I. Arriaga-Weiss (eds). *Memorias XXXII Congreso Nacional de Control Biológico*. Sociedad Mexicana de Control Biológico. Noviembre de 2009, Villahermosa, Tabasco, México.
- Holman, F., and D. C. Peck, 2002. Economic damage caused by spittlebugs (Homoptera: Cercopidae) in Colombia: A first approximation of impact on animal production in *Brachiaria decumbens* pastures. *Neotropical Entomology* 31: 275-284.
- Hu, K., and J. M. Webster. 2000. Antibiotic production in relation to bacterial growth and nematode development in *Photorhabdus-Heterorhabditis* infected *Galleria mellonella* larvae. *FEMS Microbiology Letters* 189: 219-223.

- Kaya, H. K. 1990. Soil ecology. *In*: Gaugler, R. & H. K. Kaya (eds). Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 93-116.
- Kaya, H. K. and A. M. Koppenhöfer 1996. Effects of microbial and other antagonistic organism and competition on entomopathogenic nematodes. *Biocontrol Science Technology*, 6: 333-345.
- King, A. B. S. 1975. Factors affecting the phenology of first brood of the sugarcane froghopper *Aeneolamia varia saccharina* (Dist.) (Homoptera: Cercopidae) in Trinidad. *Bulletin of Entomological Research*, 65: 359-372.
- Kung, S. P., R. Gaugler, and H. K. Kaya. 1991. Effect of soil temperature, moisture, and relative humidity on entomopathogenic nematodes persistence. *Journal Invertebrate of Pathology*. 57; 242- 249.
- Lastra B., L. A. Gómez L., y U. V. Castro. 2007. Observaciones acerca de la mosca *Salpingogaster nigra* Schinder (Diptera Syrphidae) como depredador de ninfas de salivazo *Aeneolamia varia*. *Carta trimestral, CENICAÑA* 429:10-12.
- Leite, L. G., L. A. Machado, R. M. Goulart, F. M. Tavares, and E. A., Batista Filho. 2005. Screening of entomopathogenic nematodes (Nemata: Rhabditida) and the efficiency of *Heterorhabditis* sp. against the sugarcane root spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Fabr.) (Hemiptera: Cercopidae). *Neotropical Entomology*. 34: 785-790.
- Márquez, J. M., A. Ortiz, V. H. Motta, J. M. Lemus, E. D. Torres, y S. P. Aguirre. 2009. Evaluación de la eficiencia de planes de manejo integrado de chinche salivosa: Efecto de nuevos productos en el control de la población de ninfas y adultos de chinche salivosa (*Aeneolamia postica*). Finca La Libertad, Ingenio Palo Gordo y finca Carrizal, Ingenio La Unión. *In*: Memoria de Presentación de Resultados de Investigación Zafra 2008-2009. CENGICAÑA, Guatemala. pp. 116-126.

- Martens, E. C., K. Heungens, and H. B. Goodrich. 2003. Early colonization events in the mutualistic association between *Steinernema carpocapsae* nematodes and *Xenorhabdus nematophila* bacteria. *Journal of Bacteriology*, 185: 3147–3154.
- Martin, R. M., J. R. Cox, D. G. Alston, and F. F. Ibarra. 1995. Spittlebugs (Homoptera: Cercopidae) life cycle on buffelgrass in northwestern Mexico. *Annals of the Entomological Society of America*, 88:471-478
- Martin Jr., W. R. and R.W. Miller. 1995. Comercialization of entomopathogenic nematodes in Florida. In: Pest Management in the subtropics. Biological Control Florida. Intercepted Ltd.
- Moreno-Salguero, C. A., A. E. Bustillo-Pardey, J. C. López-Núñez, U. Castro-Valderrama, y G. D. Ramírez-Sánchez. 2012. Virulencia de nematodos entomopatógenos para el control del salivazo *Aeneolamia varia* (Hemiptera: Cercopidae) en caña de azúcar. *Revista Colombiana de Entomología*, 38: 260-265.
- Obando, J. A., A. E. Bustillo, U. Castro, y N. C. Mesa. 2013. Selección de cepas de *Metarhizium anisopliae* para el control de *Aeneolamia varia* (Hemiptera: Cercopidae). *Revista Colombiana de Entomología* 39: 26-33.
- Paladini, A. y R. R. Cavichioli. 2015. A new genus and new species of spittlebug (Hemiptera: Cercopidae: Ischnorhininae) from Southern Brazil. *Zoologia*, 32: 47-52.
- Parsa S., G. Sotelo, y C. Cardona. 2011. Characterizing herbivore resistance mechanisms: spittlebugs on *Brachiaria* spp. as an example. *Journal of Visualized Experiments*, 52: e3047, doi 10.3791/3047.
- Peck, D.C., U. Castro, F. López, A. Morales, y J. Rodríguez. 2001. First records of the sugar cane and forage grass pest, *Prosapia simulans* (Homoptera: Cercopidae), from South America. *Florida Entomologist* 84:402-409.
- Peck, D. C., A. M. Pérez, y J. W. Medina. 2002. Biología y hábitos de *Aeneolamia reducta* y *A. lepidior* en la costa Caribe de Colombia. *Pasturas Tropicales*, 24: 16-26.

- Peck, D. C., A. M. Pérez, J. W. Medina, M. Barrios, y J. Rojas. 2014. Fenología de *Aeneolamia reducta* en la Costa Caribe de Colombia. *Pasturas tropicales*, 24: 39-55.
- Poinar, G. O. Jr. 1990. Biology and taxonomy of Steinernematidae and Heterorhabditidae. pp. 23–62 In Gaugler R. and H. K. Kaya (eds.) *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Poinar, G. O. Jr., and B. Linares. 1985. *Hexamermis dactylocercus* sp. n. (Mermithidae: Nematoda), a parasite of *Aeneolamia varia* (Cercopidae: Homóptera) in Venezuela. *Revue de Nématologie*, 8: 109-111.
- Ramón M., M. Pérez, C. Mendoza y F. Mauriello 2002. Reacción de 18 cultivares de caña de azúcar al ataque del taladrador de las caña de azúcar *Diatraea* spp. en el Estado Portuguesa, Venezuela. *Revista Facultad Agronomía (Caracas)*, 19: 210-218.
- Ravaneli, G. C., D. B. García, L. L. Madaleno, M. A. Mutton, J. P. Stupiello, and M. J. R. Mutton. 2011. Spittlebug impacts on sugarcane quality and ethanol production. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 46: 120-129.
- Riess H., C. M., y S. Cáceres Flores. 1976. Catálogo de Plagas y Enfermedades de la Caña de Azúcar en México. Comisión Nacional de la Industria Azucarera; Serie de divulgación técnica IMPA, Libro No. 1. México, 177 p.
- Rossini-Guimaraes, E., M. A. Mutton, M. J. Rossini-Mutton, I. Tiraboschi-Ferro, G. C. Ravaneli, and J. A. Da Silva. 2008. Free proline accumulation in sugarcane under water restriction and spittlebug infestation. *Scientia Agricola* 65: 628-633.
- Samuels K. D. Z., J. B. Heale and M. Llewellyn. 1989. Characteristics relating to the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* toward *Nilaparvata lugens*. *Journal of Invertebrate Pathology* 53:25-31.

- Salgado, G. S., L. Bucio, A., D. Riestra, y E. Lagunés. 2003. Caña de Azúcar: Hacia un manejo sustentable. Colegio de Postgraduados; Villahermosa Tabasco. México 394 p.
- SIAP. 2011. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación (SAGARPA), México. (El Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera). [www.siap.gob.mx](http://www.siap.gob.mx).
- Smart Jr., G. C. 1994. *Steinernema scapterisci*, a nematode parasite of mole crickets, *Scapteriscus* spp. Nematology Circular No. 206. Fla. Dept. Agric. & Consumer Serv. Division of Plant Industry. Gainesville, FL. 2 p.
- Sotelo, P. A., M. F. Miller, C. Cardona, J. W. Miles, G. Sotelo, and J. Montoya. 2008. Sublethal effects of antibiosis resistance on the reproductive biology of two spittlebug (Hemiptera: Cercopidae) species affecting *Brachiaria* spp. Journal of Economic Entomology, 101: 564-568.
- Stock, S. P., and H. B. Goodrich. 2008. Entomopathogenic nematodes and their bacterial symbionts: The inside out of a mutualistic association. Symbiosis 46: 65-75.
- Taliaferro, C. M., R. A. Byers, and G. W. Burton. 1967. Effects of Spittlebug Injury on root production and sod reserves of coastal bermudagrass. Agronomy Journal, 59: 530-532.
- Tiago, P. V., H. M. Lima-Souza, J. B. Moyses, N. T. Oliveira, N. T. and E. A. Alvares-Lima. 2011. Differential pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* and the control of the sugarcane root spittlebug *Mahanarva fimbriolata*. Brazilian Archives Biology Technology, 54: 435-440.
- Thompson, V. 2004. Associative nitrogen fixation, C4 photosynthesis, and the evolution of spittlebugs (Hemiptera: Cercopidae) as major pests of neotropical sugarcane and forage grasses. Bulletin of Entomological Research, 94: 189-200.
- Thompson, V., y L. González, 2005. La identificación y distribución de los salivazos de la caña de azúcar y los pastos (Homoptera: Cercopidae) en Costa Rica. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica), 75: 43-51.

Valério, J.R. y O. Nakano. 1988. Danos causados pelo adulto da cigarrinha *Zulia entreiriana* na produção e qualidade de *Brachiaria decumbens*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 23: 447-453.

Valério, J. R., C. Cardona, D. C. Peck, y G. Sotelo. 2001. Spittlebugs: Bioecology, host plant resistance and advances in MIP. In: Proceedings: Grassland ecosystem: An outlook into the 21<sup>st</sup> Century. Brazilian Society of Animal Husbandry, Sao Pedro, Sao Paulo, Brasil. P. 1-12.

## **HIPOTESIS**

- La aplicación de nematodos nativos de la zona centro de Veracruz, reducirán la sobrevivencia de ninfas de salivazo al atravesar la capa espumosa que las recubre, para ocasionar infección y muerte a niveles tales, que puedan considerarse como agentes de control biológico efectivo de las poblaciones plaga.

## **OBJETIVO GENERAL**

Llevar a cabo el aislamiento y caracterización de nematodos entomopatógenos en la zona cañera del Centro de Veracruz, México y determinar su patogenicidad en ninfas de mosca pinta *Aeneolamia* spp. y *Prosapia* spp.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Aislar a través de insectos cebo nematodos entomopatógenos en diferentes zonas cañeras del Estado de Veracruz, México.
- Caracterizar morfológica y molecularmente los aislados de nematodos entomopatógenos nativos.
- Evaluar la efectividad de nematodos entomopatógenos nativos sobre ninfas de mosca pinta en parcelas de caña de azúcar del Centro de Veracruz.

### **CAPÍTULO 3. IDENTIFICACIÓN DE DOS ESPECIES DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS *Steinernema* sp. Y *Heterorhabditis indica* (CP13JA) EXTRAÍDOS DE SUELO EN CAÑA DE AZÚCAR, EN VERACRUZ, MÉXICO.**

#### Resumen

Se describe una nueva especie de *Steinernema* y se reporta la presencia de *Heterorhabditis indica* cepa CP13JA. Ambos nematodos extraídos de muestras de suelo en cultivos de caña de azúcar en los ingenios Constancia (municipio Tezonapa, localidad Estrella) y la Gloria (municipio Úrsulo Galván, localidad Jareros), en el estado de Veracruz, México. La nueva especie de *Steinernema* sp. se caracteriza por presentar juveniles infectivos (JI) con papilas labiales en forma de “cuernos”, rasgo compartido con las especies del grupo filogenético IV (*S. bicornutum*-*S. ceratophorum*-*S. riobrave*). El rango de longitud del cuerpo de los JI es 410-566 $\mu$ m (498 $\mu$ m $\pm$ 6.5), y el ancho máximo del cuerpo fluctúa entre 21-32 $\mu$ m (27 $\mu$ m $\pm$ 0.4). La cutícula de los JI presenta estrías transversales a lo largo de todo el cuerpo, campo lateral con un número máximo de 8 incisuras en la parte media del cuerpo. Una característica que separa a esta especie de otras especies del grupo IV en la filogenia del género *Steinernema*, es la presencia de pequeñas anastomosis ubicadas después del poro excretor y hasta antes del inicio del ano, en la región ventral del cuerpo. La longitud del cuerpo de los machos de la primera generación oscila entre 1144-1827 $\mu$ m (1392 $\mu$ m $\pm$ 36.5); la cola presenta 11 pares de papilas genitales y 1 papila pre-cloacal impar ventral anterior a la cloaca, un par de papilas ad-cloacales, tres pares de papilas post-cloacales y dos pares de papilas latero dorsales post-cloacales. El largo del cuerpo de los machos de la segunda generación fluctúa entre 274-392 $\mu$ m (347 $\mu$ m $\pm$ 6.4), la cola de los mismos presenta una espina caudal en la parte terminal. La cola de las hembras de primera generación presenta un mucrón. El largo del cuerpo de las mismas varía entre 5937-9759 $\mu$ m (6954 $\mu$ m $\pm$ 172). La vulva está situada pasando la región media del cuerpo (60%). La cola de las hembras de la segunda generación presenta un



hinchamiento en el labio posterior anal; la longitud del cuerpo varia de 2573-4047 $\mu\text{m}$  (3169 $\mu\text{m}\pm 13.9$ ), y la vulva se ubica al 60% del cuerpo.

Entre los datos biológicos de esta especie se destaca la presencia de una sola generación de adultos cuando los nematodos son criados *in vivo* entre 30-35°C. Además los JI presentan una emergencia seis días después de la infección a esta misma temperatura. Los nematodos producen dos generaciones de adultos cuando los mismos son criados *in vivo* a temperaturas que oscilan entre 22 y 25°C. La emergencia de los JI a esta misma temperatura ocurre a los 11 días post infección. El análisis filogenético considerando secuencias de dos genes ribosómicos ITS y 28S, conjuntamente con el gen mitocondrial (12S) adjudican a la nueva especie como un miembro del grupo IV y cercano a la especie *Steinernema riobrave*.

PALABRAS CLAVE: Taxonomía, filogenia, grupo IV, caña de azúcar.

### 3.1 Introducción

El cultivo de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) se ve afectado en su rendimiento por una diversidad de problemas fitosanitarios; entre los que destacan los daños ocasionados por los insectos conocidos como salivazos o mosca pinta. Estos forman un complejo de especies pertenecientes a los géneros *Aeneolamia* spp. y *Prosapia* spp. (Hemiptera: Cercopidae) (Ramón *et al.*, 2002). El salivazo se distribuye desde el sureste de Estados Unidos de Norte América hasta el noreste de Argentina, desde los 0 hasta los 3000 msnm (Peck, 2001). Es considerado uno de los principales problemas fitosanitarios de la caña de azúcar, ya que está presente en cerca del 60% de los ingenios existentes en México (CONADESUCA 2011). Los géneros *Aeneolamia* y *Prosapia* son los más abundantes y representativos en la vertiente del Golfo de México, donde el inicio de las lluvias y el incremento de temperatura marcan la pauta para que se presente (Flores 1994, Enríquez *et al.*, 1999). Los primeros estadios ninfales se alimentan de la savia de

las raíces y se recubren con una capa espumosa que los protege de la desecación e invasión de enemigos naturales (Tompson y León-González, 2005).

A pesar de que esta plaga se ha combatido mediante insecticidas organosintéticos, la necesidad de reducir los efectos negativos de estos agroquímicos en campo ha favorecido la búsqueda y aplicación de organismos útiles para el control biológico. Por ejemplo, uno de ellos ha sido la implementación del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Castillo 2006; Samuels *et al.*, 1989). Sin embargo, este bioinsecticida efectivo principalmente en el control de adultos, ha demostrado una baja actividad para el control de las ninfas que se alojan y protegen en las raíces. Esto ha obligado a buscar nuevas estrategias para el manejo del salivazo. Por ejemplo se han encontrado nematodos mermitidos (Poinar Jr. y Linares, 1985) y Steinernematidos y Heterorhabditidos de los géneros *Steinernema* spp. (Hernández-Rosas *et al.*, 2007) y *Heterorhabditis* spp. (Ferrer *et al.*, 2004), que parasitan en forma natural a ninfas de mosca pinta (Ferrer *et al.*, 2004; Leite *et al.*, 2005; De Paula Batista y Machado, 2010).

Teniendo en cuenta estos estudios, en los años 2012 y 2013 iniciamos la búsqueda de nematodos entomopatógenos nativos, en diferentes ingenios en la zona del Golfo de México, implementando la técnica de cebos con larvas de *Galleria mellonella* (Bedding y Akhurst, 1975). A través de estos estudios se obtuvieron cuatro aislamientos de nematodos entomopatógenos en zonas con alta densidad poblacional del salivazo en la caña de azúcar. En este estudio realizamos la identificación de dos especies de nematodos entomopatógenos a través de caracteres morfológicos, morfométricos y la aplicación de técnicas moleculares.

## 3.2 Materiales y Métodos

### 3.2.1 Origen de los nematodos entomopatógenos

Los nematodos fueron aislados de muestras de suelo colectadas en zonas de cultivo de caña de azúcar en agosto de 2013, para lo cual se utilizaron larvas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) como insecto cebo (Sturhan y Mracek, 2000). Los cadáveres infectados se esterilizaron al sumergirlos en alcohol etílico 96° durante 10 segundos, seguido de dos cambios de agua destilada estéril para posteriormente ser transferidos a trampas de White (White, 1927), siguiendo los procedimientos descritos por Woodring y Kaya (1988) para la cosecha de juveniles infectivos (JI). Los juveniles resultantes se almacenaron en frascos de cultivo de tejidos (Corning) de 250 ml a  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$  (Grewal et al., 1994).

### 3.2.2 Caracterización morfológica: Microscopia de luz

Los nematodos usados en este estudio fueron obtenidos del último estadio de *G. mellonella*. Seis larvas fueron expuestas a aproximadamente 700 JI de cada uno de los aislados; y se colocaron en cajas de Petri de 60 x 15 mm provistas con dos círculos de papel filtro Whatman N° 1 humedecido e incubados a  $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . La primera y segunda generación fue obtenida entre los días 3 y 4 post-infección ( $25^{\circ}\text{C}$ ) y 6 a 7 días post-infección ( $25^{\circ}\text{C}$ ) para cada generación. Los juveniles infectivos que emergieron de los cadáveres fueron colectados de trampas White (White, 1927) entre los días 11 y 12 ( $25^{\circ}\text{C}$ ) post-infección.

Todas las muestras de nematodos incluyendo los JI, así como los adultos de la primera y segunda generación fueron fijados para su identificación. Primeramente los especímenes fueron matados en calor (baño María) en 7 ml de agua a  $65^{\circ}\text{C}$  y luego fijados en trietanolamina-formalina (TAF). Posteriormente los especímenes fueron procesados a través de glicerol anhidrido mediante la metodología propuesta por Seinhorst (1959) y modificada por Cid del Prado-Vera et al (2010). Los montajes permanentes se realizaron en portaobjetos con anillos de cera como soportes para evitar el aplastamiento de los nematodos. Las medidas de los especímenes fueron realizadas mediante un microscopio óptico Photomicroscope III (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany), con el apoyo del programa Image Tool (Wilcox et al., 2002).

### 3.2.3 Microscopia electrónica de barrido (MEB)

La primera generación de adultos para el aislamiento de *Steinernema* así como de la segunda generación de *Heterorhabditis*; y los JI de ambos aislamientos, se mataron con calor en 7 ml de agua a 65°C y posteriormente se fijaron en glutaraldehído 3 % por 6 días a  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  (Nguyen y Smart, 1995). Posteriormente los especímenes fueron lavados cada 24 h con buffer de fosfatos. Finalmente los nematodos fueron deshidratados en gradientes secuenciales de alcohol etílico (OH) en concentraciones de 5, 10, 20, hasta 96 y 100% durante 20 min. Las muestras en alcohol 70% fueron colocadas en un sonificador para eliminar posibles residuos adheridos en la cutícula de los ejemplares antes de completar su fijación en alcohol 100%. Los ejemplares en alcohol 100% fueron pasados por 3 cambios de 20 min cada uno (Eisenback, 1991). Los nematodos deshidratados se secaron en una cámara de punto crítico con CO<sub>2</sub>, se montaron en porta-muestras y se recubrieron con oro/paladio (80/20%) durante un periodo de 5 min para su examinación en un microscopio JEOL JSM-6390 a 10 KV de voltaje de aceleración.

### 3.5 Análisis Molecular

Para la extracción del ADN de las cepas en este estudio se utilizó el kit DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se pesaron 0.5 mg de juveniles infectivos y se colocaron en un mortero al que se le añadió nitrógeno líquido, para pulverizarlos. Posteriormente, cada cepa se colocó en tubos Eppendorf de 1.5 ml. continuando con el protocolo del kit. La calidad del ADN obtenido se determinó por espectrofotometría en un NanoDrop 2000 UV-Vis (Thermo Scientific, USA). Se consideró al ADN de buena calidad cuando las relaciones de absorbancia  $A_{260}/A_{280}$  y  $A_{260}/A_{230}$  se presentaron en un rango de 1.8 a 2.0.

Se amplificaron las dos regiones ribosómicas: ITS y 28S del rADN, así como el gen mitocondrial 12S. Los iniciadores usados para la región del ITS que comprenden los loci ITS1+5.8S+ITS2 fueron, TW81 5'-GTTCCGTAGGTGAACCTGC-3' (Joyce *et al.* 1994) y AB28 5'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3' (Howlett *et al.* 1992). Los iniciadores para el gen 28S que comprende el dominio D2-D3 fueron 28SF: 5'-AGCGGAGGAAAAGAACTAA-3' y 28SR: 5'-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3' (Stock *et al.*, 2001). Para la amplificación de la región 12S del gen mitocondrial se usaron los iniciadores 12SF: 5'-GTTCCAGAATAATCGGCTA-3' y 12SR: 5'-ATTGACGGATG(AG)TTTGTACC-3' (Ferri *et al.*, 2009).

Los productos de PCR amplificados se verificaron por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.5 % teñido con GelRed™ (Biotium, USA) a 80 Volts durante 1:40 h. Los productos amplificados se limpiaron con el método enzimático de ExoSAP-IT (Affymetrix, USA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La reacción de secuenciación se realizó con el BigDye Terminator v 3.0 (Applied Biosystems, USA), en un volumen total de 20 µL conteniendo 4.0 µL (2.5 X) de Ready Reaction Premix, 2.0 µL (5X) de BigDye Sequencing Buffer, 4 pM de cada iniciadores y 2.0 µL de DNA templado. Cada muestra se secuenció en ambas direcciones en un Genetic Analyzer 3730xl (Applied Biosystems, USA).

Las secuencias se ensamblaron y editaron con el programa bioinformático BioEdit v7.2.5 (Hall, 199) para crear secuencias consenso. Estas secuencias se compararon en la base de datos del GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI) con la opción BlastNucleotide (BLASTN) (Zhang *et al.*, 2000). Las secuencias de consenso de cada región fueron alineadas con especies de comparación con mayor hit, usando el programa Muscle (Edgar, 2004) incluido en el programa MEGA6.06 (Kumar *et al.*, 2008). El alineamiento de cada región se cortó en los extremos para obtener secuencias de la misma longitud.

### 3.3.1 Reconstrucción Filogenética

Para la reconstrucción filogenética de cada una de las regiones secuenciadas (ITS, 28S y el gen mitocondrial 12S), se usó inferencia Bayesiana con el programa MrBayes v3.2.6 (Ronquist y Huelsenbeck, 2003), con 1, 000,000 de generaciones. El análisis se realizó con las cadenas ocultas de Markov (MCMC), con una cadena fría y tres cadenas calientes. La frecuencia de muestreo fue de 1:100. Para obtener el árbol consenso y la inferencia Bayesiana a posteriori se usó el modelo más complejo de evolución disponible para nucleótidos (GTR + distribución gama + posiciones invariantes) (Ronquist y Huelsenbeck, 2003). Para cada uno de los genes se utilizaron como grupos fuera a *Steinernema nepalense* para la región ITS, *Caenorhabditis elegans* para 28S y *S. scarabei* para 12S.

## 3.4 Resultados

### 3.4.1 Descripción *Steinernema* sp. cepa CP13ES

#### 3.4.1.1 Machos primera generación

Cuerpo en forma de C que se curva ventralmente posterior a la muerte por calor. Anillos cuticulares finos transversales a lo largo del cuerpo. Región anterior redondeada y continua al cuerpo. Presencia de seis papilas labiales, cuatro papilas cefálicas y dos anfidios evidentes, localizados entre las papilas labiales y cefálicas en forma de pequeñas hendiduras. El poro excretor es muy evidente (Fig. 4 E), y visible al inicio del itsmo, justo antes del anillo nervioso. Gónadas simples, reflejadas. Las espículas amarillo-doradas, pareadas, curvadas. Manubrio ligeramente alargado, calomo engrosado, pero no más que el manubrio; presencia de velum (Fig. 5 A), visible tanto en microscopía electrónica de barrido (MEB) como en microscopía de luz. Las espículas con terminación en punta. El gubernáculo ensanchado en su parte media, presentando una forma de canoa en

vista lateral. Existen 11 pares de papilas genitales y una papila independiente (o impar) en posición ventral (Fig. 4 D) distribuidas de la siguiente manera: cinco pares de papilas precloacales en posición ventral, una papila individual ventral anterior a la cloaca, un par de papilas adcloacales, tres pares de papilas postcloacales y dos pares de papilas latero dorsales postcloacales. Terminación de la cola redondeada, sin presencia de mucrón (Fig. 3 B).



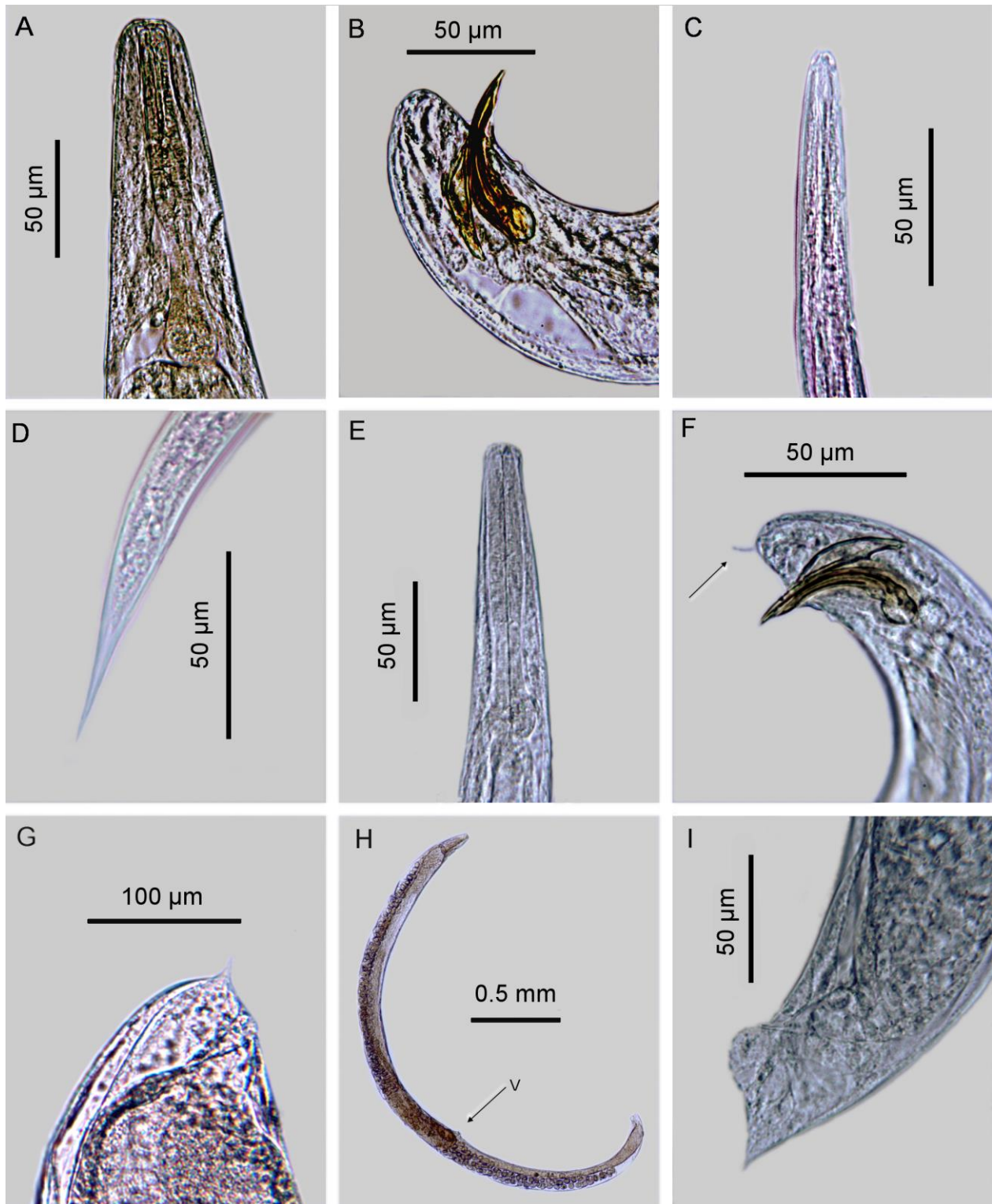


Figura 3. *Steinernema* sp. cepa CP13ES. Microscopía de luz. A y B, machos de primera generación: A, región anterior; B, región posterior; C y D, corresponden al estadio J1: C, región anterior del cuerpo; D, región posterior; E y F, machos de segunda generación en región anterior y posterior respectivamente, resaltando la presencia de una espina caudal. G, hembra de primera generación mucrón al término de la cola; H, hembra de segunda generación con vulva al 60%; e (I) hinchamiento del labio posterior anal.



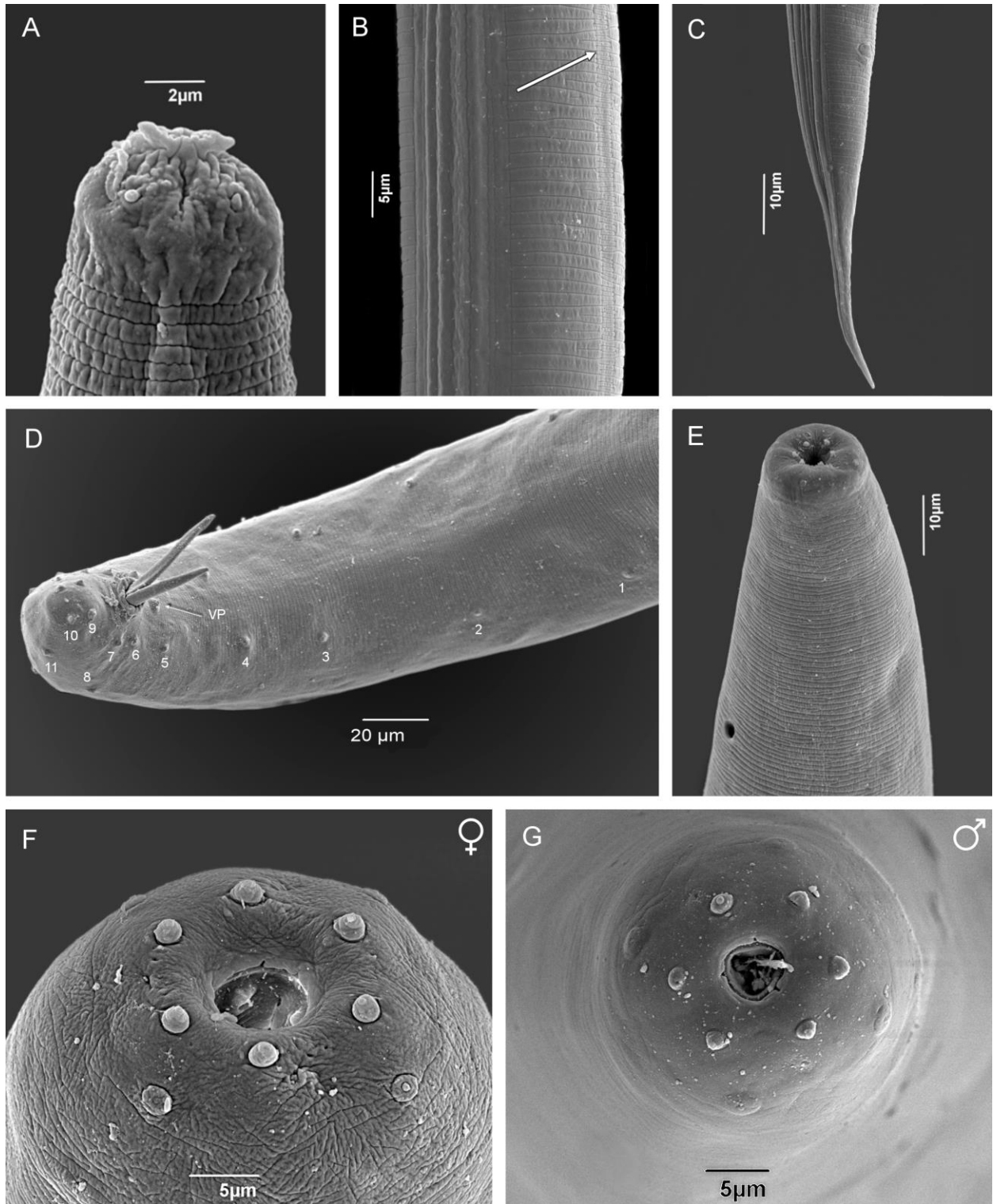


Figura 4. *Steinernema* sp. cepa CP13ES. MEB. A y C juvenil infectivo con papilas labiales en forma de “cuernos”, campo lateral y B, presencia de anastomosis. C, juvenil infectivo con terminación de la cola en punta. D, región posterior de macho de primera generación mostrando disposición de papilas caudales, E, región anterior de macho de primera generación observándose el poro excretor. F, región anterior de hembra de primera generación. F, macho de primera generación mostrando las papilas labiales y cefálicas.



Figura 5. A, Vista lateral de espículas con presencia de velum. B, vista frontal de gubernáculo.

#### 3.4.1.2 Machos segunda generación

Presentan características similares a los de la primera generación en su morfología general, excepto que en la parte posterior al término de la cola presentan una espina caudal (Fig. 3 F), no presente en la primera generación; así como muchas de las mediciones corresponden a un menor tamaño (Cuadro 1).

#### 3.4.1.3 Hembras primera generación

La cutícula presenta finas anulaciones. La región anterior es redondeada mostrando una continuidad con el cuerpo, la abertura oral circular; papilas internas no evidentes al lado de la boca, presencia de seis papilas labiales sobresalientes rodeando el estoma, y cuatro papilas cefálicas al nivel de la base del estoma (Fig. 4 F). Los anfidios están presentes y localizados entre las papilas labiales y cefálicas en forma de pequeñas hendiduras. El estoma presenta queilorabdiones ligeramente visibles en microscopia de luz. El esófago es tipo rabadiforme, muscular, con un procorpus cilíndrico, un metacorpus ligeramente ensanchado y un itsmo evidente y similar a los descritos en otras especies de *Steinernema*. El bulbo basal ligeramente piriforme. El poro excretor situado en la parte media del corpus. El anillo nervioso esta siempre ubicado y rodeando la parte media del

itsmo, situado justo antes del bulbo basal. Las gónadas son didélficas, curvadas dorsalmente. La vulva está localizada en el 60% de la longitud del cuerpo (Fig. 3 H), partiendo de la región anterior; ambos labios de la vulva están ligeramente protruidos y carecen de epitigma. La cola es redondeada, con un mucrón con terminación en punta en la parte final de la cola (Fig. 3 G), la abertura anal es conspicua, y la región postanal no hinchada.

#### 3.4.1.4 Hembras segunda generación

Similares a la primera generación en toda la morfología general pero mucho más pequeñas (Cuadro 1). Presencia en la parte posterior de la cola de un evidente hinchamiento anal o hinchamiento en el labio posterior anal (Fig. 3 I), característica no observada en las hembras de primera generación, así como la cola ligeramente alargada, conoide, y con terminación en punta, vulva siempre ubicada al 60%.

#### 4.4.1.5 Juveniles infectivos

Mediciones mostradas en la Cuadro 1. Cuerpo delgado, alargado, encerrado en una muda o vaina del J2. Boca y ano no funcionales. Parte anterior redondeada, con proyecciones de los labios laterales del estoma en forma de “cuernos” en su parte distal (Fig. 4 A). Región labial lisa, continua. Anfidios poco visibles, presencia evidente de cuatro papilas cefálicas en MEB. Esófago largo, estrecho; itsmo delgado y rodeado por el anillo nervioso en la parte media, bulbo basal visible. Cutícula con múltiples estrías transversales prominentes. Campos laterales visibles ordenados de la siguiente manera iniciando con 2,5,6,8 en su número máximo en la parte media del cuerpo, seguido por 6,5,4,2 ubicado casi en la parte final de la cola. Presencia de anastomosis cortas (Fig. 4 B) ubicadas en la región ventral, después del poro excretor hasta antes del inicio del ano (Fig. 4 C). Fasmidio presente posterior al ano. Cola atenuada que disminuye gradualmente hasta presentar una terminación en punta.

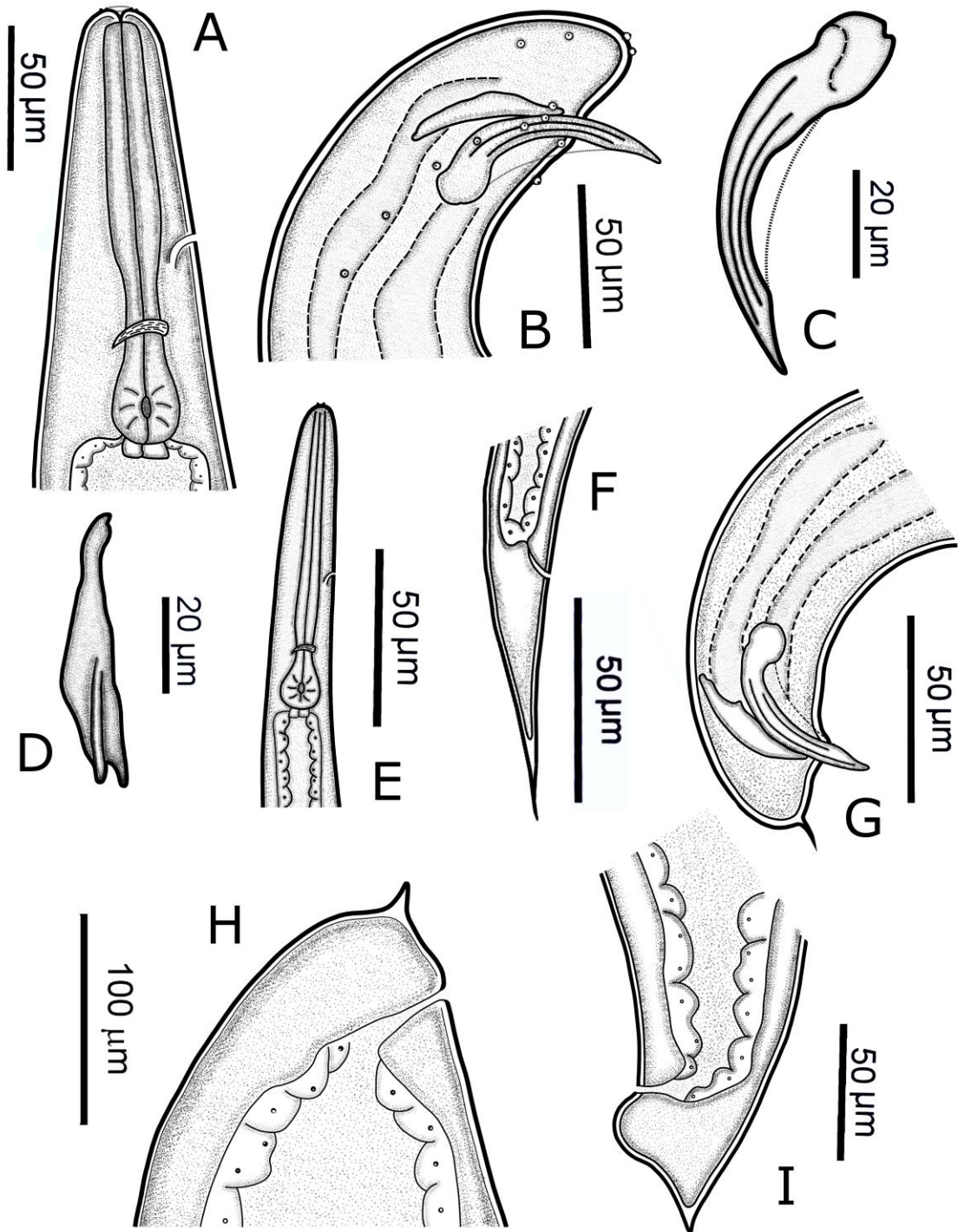


Figura 6. *Steinernema* sp. cepa CP13ES. A y B, macho de primera generación: A, región anterior y B, región posterior. C y D, macho de primera generación: C, espículas con presencia de velum y, D, gubernáculo. E y F, juvenil infectivo: E, región anterior y, F, región posterior con terminación de la cola en punta. G, macho de segunda generación con una espina caudal al término de la cola. H, hembra de primera generación con presencia de mucrón al término de la cola. I, hembra de segunda generación mostrando un hinchamiento del labio posterior anal.

Cuadro 1. Morfometría de machos y hembras de primera generación, y juveniles infectivos de *Steinernema* sp. cepa CP13ES. Indicando número de individuos medidos, promedio, error estándar, así como el mínimo y máximo de las medidas obtenidas. TBL= ancho total del cuerpo, MBW= anchura media del cuerpo, EP= distancia de la región al poro excretor, NR= distancia de la región anterior al anillo nervioso, ES= largo del esófago, TL= largo de la cola, ABW= anchura media del ano, SpL= largo de las espículas, GuL= largo del gubernáculo.

Cepa Carácter	Machos			Hembras			Juveniles Infectivos
	Primera generación 25°C	Primera generación 30°C	Segunda generación 25°C	Primera generación 30°C	Primera generación 25°C	Segunda generación 25°C	Jl
N	30	30	22	30	30	25	30
TBL	1392±36.5 (1144-1827)	1145±13.8 (1022-1351)	347±6.4 (274-392)	7414±195.6 (5996-9832)	6954±172 (5937-9759)	3169±13.9 (2573-4047)	498±6.5 (410-566)
MBW	107±2.8 (84-142)	69±0.8 (62-83)	23±0.5 (15-26)	253±5.9 (193-356)	260±5 (254-344)	134±0.6 (109-171)	27±0.4 (21-32)
EP	65±1.5 (52-79)	65±1 (54-74)	48±1.1 (38-56)	81±1.5 (60-93)	80±1.2 (71-92)	132±3.9 (63-162)	32±0.8 (31-48)
NR	100±1.3 (88-116)	108±0.8 (98-117)	89±1.6 (75-106)	129±1.7 (104-147)	123±1.3 (110-136)	246±9.8 (102-298)	63±0.9 (52-71)
ES	142±1.4 (129-163)	154±1.1 (141-164)	120±1.5 (103-133)	180±2.2 (157-208)	171±2.2 (141-189)	360±11.8 (154-413)	87±1.2 (72-98)
TL	32±0.5 (27-38)	31±0.5 (24-37)	21±0.6 (15-27)	58±1.2 (45-74)	53±1.2 (39-65)	147±(3.8 (101-177)	52±0.7 (44-61)
ABW	49±0.73 (40-56)	49±1 (39-60)	34±0.6 (28-40)	100±2.1 (78-126)	85±1.5 (69-99)	92±1.6 (74-105)	15±0.3 (13-18)
SpL	75±0.8 (67-84)	77±0.6 (70-84)	60±1 (51-70)				
GuL	46±0.8 (39-57)	47±0.4 (42-52)	36±0.8 (29-45)				
a=TBL/MBW	13	16	15	29	27	16	19
b=TBL/ES	10	7	3	41	41	9	6
c = TBL/TL	44	37	16	127	131	21	9
D%= EP/ESx100	46	42	40			37	37
E%= EP/TLx100	205	212	225			90	61
SW= SpL/ABWx100	154	157	178				
GS= GuL/SpLx100	61	61	60				
FL							2,5,6,8,6,5,4,2

### 3.4.2 Localidad y hospedero

Los nematodos fueron encontrados en el estado de Veracruz, México en muestras de suelo de cultivos de caña de azúcar de la zona de abastecimiento del ingenio Constanca, municipio Tezonapa, localidad Estrella (18°36'N, 96°41'W; 220 msnm), perteneciente al estado de Veracruz, México. El hospedero de esta especie es desconocido, ya que se recuperó de suelo utilizando larvas de *G. mellonella*.

Cuadro 2. Comparación morfológica y morfométrica de JI (juveniles infectivos), machos y hembras de primera y segunda generación de especies pertenecientes al grupo IV, nematodos con “tipo cuernos” *S. bicomutum*-*S. ceratophorum*-*S. riobrave*.

Especie	<i>S. bicomutum</i> (Yugoslavia) Talloso <i>et al.</i> , 1995	<i>S. ceratophorum</i> (China) Jian <i>et al.</i> , 1997	<i>S. riobrave</i> (Texas) Cabanillas <i>et al.</i> , 1994. Nguyen & Adams, 2003	<i>S. abbasi</i> (Arabia) Elewad <i>et al.</i> , 1997. Nguyen & Adams, 2003	<i>S. pakistanense</i> (Pakistán) Shahina <i>et al.</i> , 2001	<i>S. yirgalemense</i> (Ethiopia) Nguyen <i>et al.</i> , 2004	<i>S. aciari</i> (China) Qiu <i>et al.</i> , 2004	<i>S. bifurcatum</i> (Pakistan) Shahina <i>et al.</i> , 2014	<i>S. papillatum</i> (Venezuela) San-Blas <i>et al.</i> , 2015	<i>S. goweni</i> (Venezuela) San-Blas <i>et al.</i> , 2016	<i>Steinernema</i> sp. (México) Grifaldo- Alcántara <i>et al.</i> , 2016
Carácter único de cada especie	Dos estructuras en forma de cuerno en la región labial de los JI	Dos estructuras en forma de cuerno en la región labial de los JI	Anchura del cuello del gubernáculo tan ancho como la parte posterior del corpus	Mucrón ausente en el macho	Dos estructuras en forma de cuerno en la región labial de los JI; mucrón en 10% de los machos	Machos con un velum grande en las espículas y que van disminuyendo gradualmente	Velum algunas veces no observado en machos maduros, pero presente en machos jóvenes	Gubernáculo bifurcado tanto próxima como distalmente en los machos de primera generación	Presencia de prominentes deiridios en los machos de ambas generaciones al nivel del bulbo basal	El fasmidio puede ser visto en todas las fases, a través de microscopía electrónica de barrido	Presencia de anastomosis en JI. Emergencia de los JI a los 6 días sin presentar una segunda generación.
Juveniles infectivos Largo del cuerpo	730±52 (648-873)	706±62 (591-800)	622±39.5 (561-701)	541±24 (496-579)	683±21 (649-716)	635±36 (548-693)	1113±68 (975-1250)	521±27.3 (460-590)	617µm±83.5 (452-730)	640µm±52.3 (531-719)	498 ±6.5 (410-566)
Formula de campos laterales	6	8	2,7,8,6,2	2,6,8,7,6,2	8	2,6,8,6,2	1,4,8,5,3	2,6,8,6,2	2,4,6,8,6,2	2,4,6,8,6,2	2,5,6,8,6,5,4,2
Terminación de la cola	Conoide, terminación en punta	Conoide, terminación en punta	Ventralmente curvada y terminación en punta	Alargada, dorsalmente curvada, con una depresión ventral en la punta	Conoide, terminación en punta	Atenuada, disminuyendo gradualmente en punta	Estrecha y atenuada uniformemente	Conoide, terminación en punta	Cola conoide, con terminación en punta; porción hialina ocupando 57% del largo de la cola	Conoide, terminación en punta	Conoide, terminación en punta.
Fasmidio	No indica	No indica	Presente	Presente	Ausentes	No indica	No indica	No indica	No indica	Siempre visibles	Presente
Presencia de anastomosis	No indica	No indica	No indica	No indica	No indica	No indica	No indica	No indica	No indica	No indica	Presente
Longitud de la cola	72±5 (63-78)	66±5 (56-74)	53±3.5 (46-58.7)	56±3.2 (52-61)	58±2.1 (53-62)	62±2.7 (57-67)	78±5.2 (68-88)	54±2.45 (51-59)	61±6.0 (52-74)	67±7.8 (59-89)	52±0.69 (44-61)
Longitud del esófago	124 (113-135)	123±7 (108-144)	113.5±2.1 (108-116)	89±1.8 (85-92)	113±4.2 (108-122)	121±3.7 (115-128)	146±5 (135-157)	114±8 (102-130)	129±15.6 (104-160)	119±4.3 (109-126)	87±1.2 (72-98)
Machos 1ª gen. Largo del cuerpo	1300±150 (900-1005)	1300±134 (1100-1600)	1700±0.09 (1500-1900)	1250±189 (999-1534)	1300±89 (1200-1500)	1566±39 (1331-1777)	1597±93 (1400-1750)	1192±314 (1059-1454)	1150µm±169 (906-1436)	1055µm±66 (913-1158)	1392±36.5 (1144-1827)
Numero de papilas genitales	22 papilas y 1 independiente	22 papilas y 1 independiente	24 papilas y 1 independiente	22 papilas y 1 precloacal independiente	22 papilas y 1 independiente	22 papilas y 1 precloacal independiente	22 papilas y 1 precloacal simple	22 papilas y 1 independiente precloacal	22 papilas y 1 independiente precloacal	27 papilas y 1 papila simple ventral	22 papilas y 1 independiente
Mucrón al final de la cola	Sin mucrón	Sin mucrón	Sin mucrón	Sin mucrón	Mucrón en 10% de los machos	Sin mucrón	Sin mucrón	Sin mucrón	Sin mucrón	Mucrón ausente	Sin mucrón
Longitud del esófago	156±7 (138-167)	165±10 (149-190)	144±7.9 (128-154)	133±6 (121-144)	132±5.8 (126-146)	148±12 (132-165)	178±16 (140-200)	145±7.8 (130-158)	161±17.6 (145-228)	142±5.3 (131-150)	142±1.4 (129-163)
Longitud de las espículas	48±3.5 (38-50)	71±7 (54-90)	66±4.2 (62-75.0)	65±5.70 (57-74)	68±3.6 (62-73)	64±8 (51-77)	85	69±7.7 (60-85)	65µm±5.7 (44-63)	55µm±2.3 (50-57)	75±0.79 (67-84)
Longitud del	47±3.5	40±4	50.9±2.6	45±4.3	41±3.2	48±6.9	56±5.2	39±5.4	37±3.9	35±2.9	46±0.8

gubernáculum	(38-50)	(25-45)	(47.5-56.2)	(35-50)	(36-45)	(42-54)	(48-65)	(30-49)	(28-42)	(30-40)	(39-57)
Longitud de la cola	32±2.5 (25-35)	36±13 (11-65)	31.1±1.7 (28-35)	26±3 (20-31)	25±0.8 (24-27)	20±4 (17-27)	40±4.4 (31-47)	30±2.9 (22-34)	33±4.1 (25-42)	28±2.8 (23-32)	32±0.5 (27-38)
<b>Hembras 1ª gen.</b> Largo del cuerpo	>10000	5300±1593 (2700-11800)	6500±1.6 (3700-8300)	3510±638 (2453-4477)	9901±1591 (6461-12092)	6144±78 (4940-7029)	7233±1013 (5500-8850)	3655±1850 (2292-7477)	4209µm±2024 (1574-7978)	2861µm±734 (1836-4479)	7414±195.6 (5996-9832)
Epitigma	No indica	Sin epitigma	Sin epitigma	Con epitigma	Con epitigma	Con epitigma	No indica	Con epitigma	No indica	Con epitigma	Sin epitigma
Longitud del esófago	188±13 (163-210)	193±12 (162-225)	193±13.9 (171-211)	165±7.5 (155-176)	179±8.3 (164-194)	210±14 (182-278)	262±24 (220-307)	174±13.9 (158-200)	176±11.9 (160-201)	164±12 (135-188)	180±2.2 (157-208)
Longitud de la cola	30±6 (20-40)	36±13 (11-65)	45±3.5 (41-50)	37±3 (31-40)	49±9.8 (35-63)	46-7 (35-71)	75±12 (50-92)	43±8 (38-60)	50±11.2 (33-69)	49±10.2 (31-73)	58±1.2 (45-74)
% de la vulva	52%	54%	50%	50%	50%	51%	52%	56.6%	52%	55%	60%
Mucrón al final de la cola	Con un pequeño mucrón	Con mucrón	Con una ligera proyección, segunda generación con colas alargadas	65% de la anchura del cuerpo anal tiene un engrosamiento ventral postanal	Con una ligera proyección en forma de mucrón	Sin mucrón al final de la cola	Cola conoide con una terminación larga mamilar	Sin mucrón al final de la cola	Con mucrón	Con mucrón en algunos especímenes	Con mucrón al final de la cola
<b>Machos 2ª gen.</b> Largo del cuerpo	1007±68 (864-1143)	835±52 (727-927)	900±0.1 (800-1100)	861±121 (606-1035)	908±64 (788-1018)	999±32 (789-1144)	1133±98 (1000-1300)	621±46 (560-590)	1160±128 (875-1434)	802±216 (449-1236)	347±6.4 (274-392)
Terminación de la cola	Con un pequeño mucrón	Con mucrón	No indica	No indica	Sin mucrón	Mucrón en la cola raramente vista	Sin mucrón	Con un fino mucrón	No indica	No indica	Espina caudal
<b>Hembras 2ª gen.</b> Largo del cuerpo	1616±146 (1269-1809)	1802±396 (1227-2536)	1700±0.2 (1400-2000)	2609±622 (1897-3917)	1829±258 (1442-2339)	1859±43 (1367-2199)	2022±247 (1675-2425)	1241±403 (994-1749)	3495±570 (2365-4760)	2861±734 (1836-4479)	3169±171 (2573-4047)
Terminación de la cola	Con mucrón	Con mucrón	Con mucrón	Con mucrón en un 65%	Con un mucrón fino	Con mucrón al término de la cola	Sin mucrón	Con mucrón	No indica	No indica	Con mucrón
Hinchamiento anal	Ausente	Ausente	No indica	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Presente	No indica	Presente

#### 3.4.2.1 Etimología

*Steinernema* sp. aislamiento CP13ES, es nombrado por el Colegio de Postgraduados (CP), institución en la que se realizó la investigación, el año en que se encontró (2013), y la localidad en que fue colectada la especie (Estrella).

#### 3.4.2.2 Especímenes tipo

Los especímenes fueron depositados en la Colección Nacional de Helmintos, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (CNHE); y en la colección de nematodos del Colegio de Postgraduados México (CPNC).

#### 3.4.3 Análisis molecular y posición filogenética

El análisis de las secuencias de la región ITS1+5.8S+ITS2 del rADN identificó a la cepa CP13ES como una nueva especie de *Steinernema* y a la cepa CP13JA como *Heterorhabditis indica*. La comparación de las secuencias de la cepa CP13ES con aquellas especies más cercanas (Grupo IV) presentó diferencias de nucleótidos en varios pares de bases. En el cuadro tres se muestran estas diferencias. Las secuencias de los tres genes estudiados indicaron que la cepa CP13ES pertenece al grupo filogenético IV denominado también como *bicornutum-ceratophorum-riobrave* (Spiridonov et al., 2004). El árbol filogenético construido con el ITS1+5.8S+ITS2 muestra la separación de *Steinernema* sp. CP13ES con *S. papillatum* y *S. riobrave*, como especies más cercanas, pero evolutivamente distintas, DS= 0.006919 (Fig. 7). Los fragmentos D2-D3 de la región 28S rRNA también separan a *Steinernema* sp. CP13ES de *S. riobrave*, *S. ceratophorum* y *S. bicornutum*, así como a otras especies del grupo IV, DS= 0.00314 (Fig. 8). El análisis del gen mitocondrial 12S, coincidió con los análisis de los genes ribosómicos en diferenciar a la cepa CP13ES como una posible nueva especie y cercana a *S. riobrave*, DS= 0.006410 (Fig. 9).







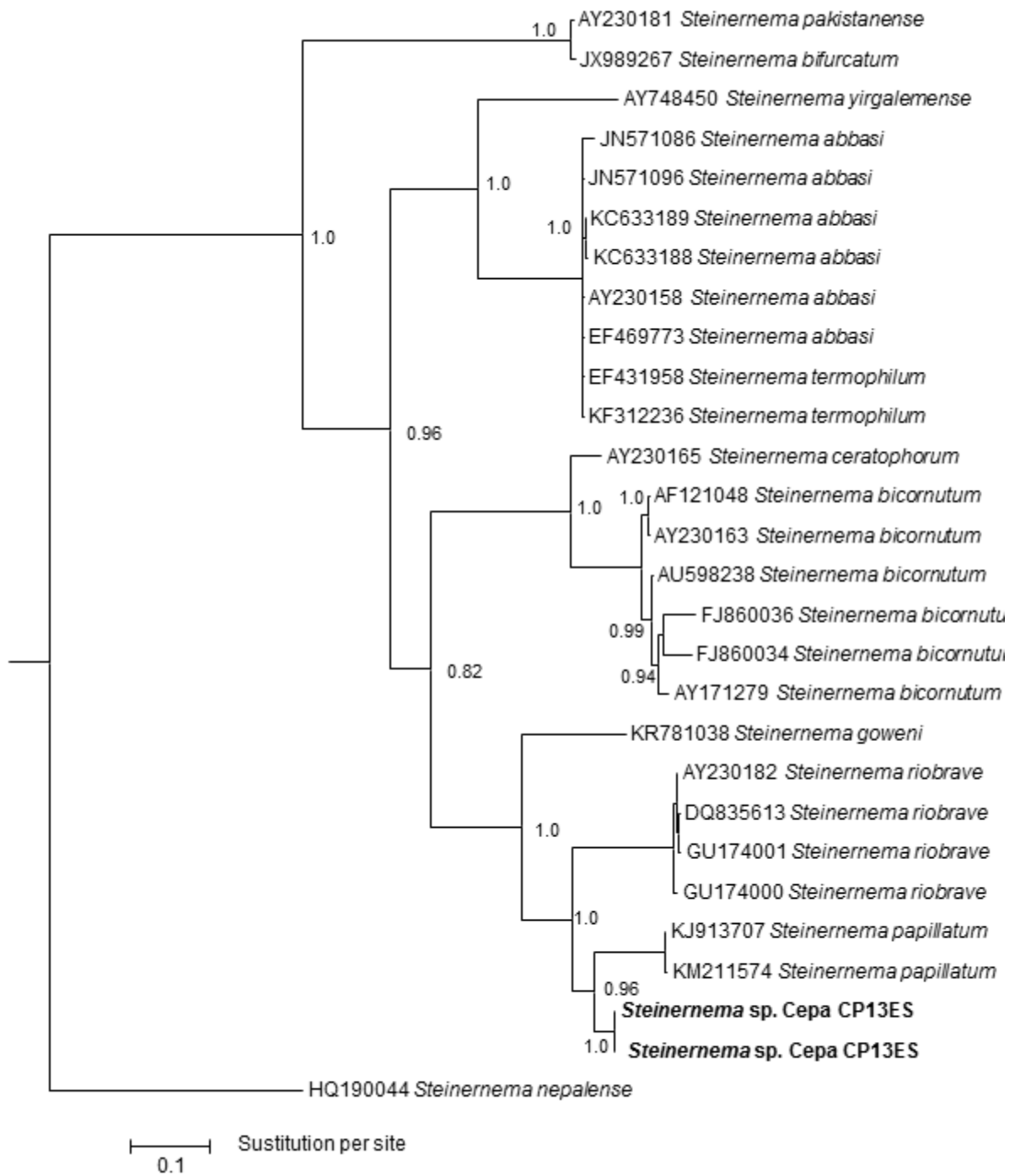


Figura 7. Árbol filogenético construido con inferencia Bayesiana con Mr Bayes, considerando 1M de generaciones muestreadas cada 100 generaciones. El 25% de los árboles fueron descartados y la probabilidad posterior se determinó con los árboles restantes. Se usó a *S. nepalense* como especie fuera de grupo.

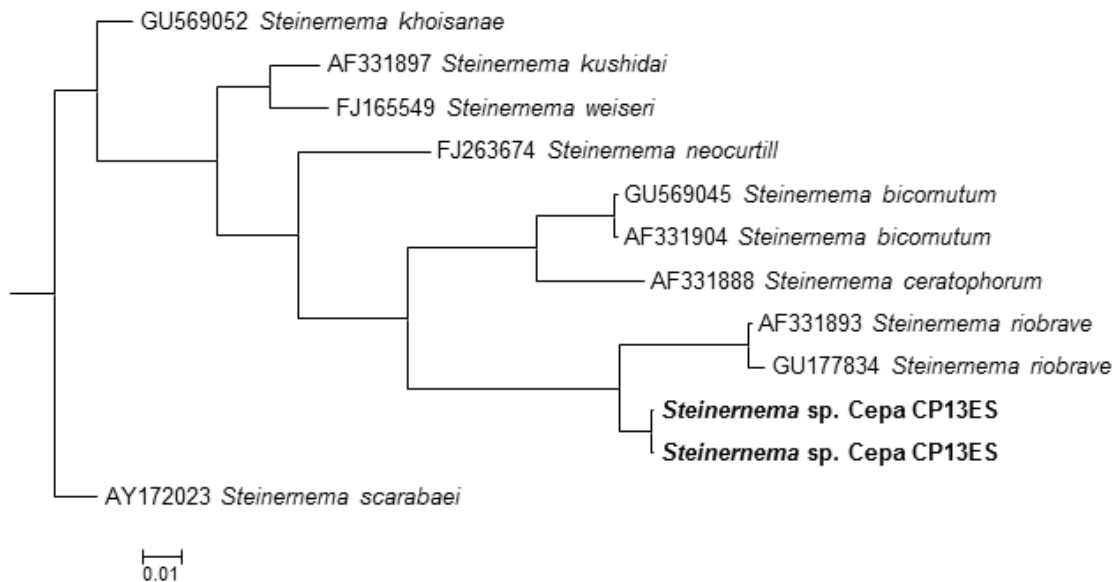


Figura 8. Relación filogenética basado en la región 28S mediante inferencia Bayesiana. *Steineremema scarabaei* fue utilizado como taxa fuera de grupo. La filogenia fue construida con Mr Bayes, considerando 1M de generaciones muestreadas cada 100 generaciones. El 25% de los árboles fueron descartados y la probabilidad posterior se determinó con los árboles restantes.

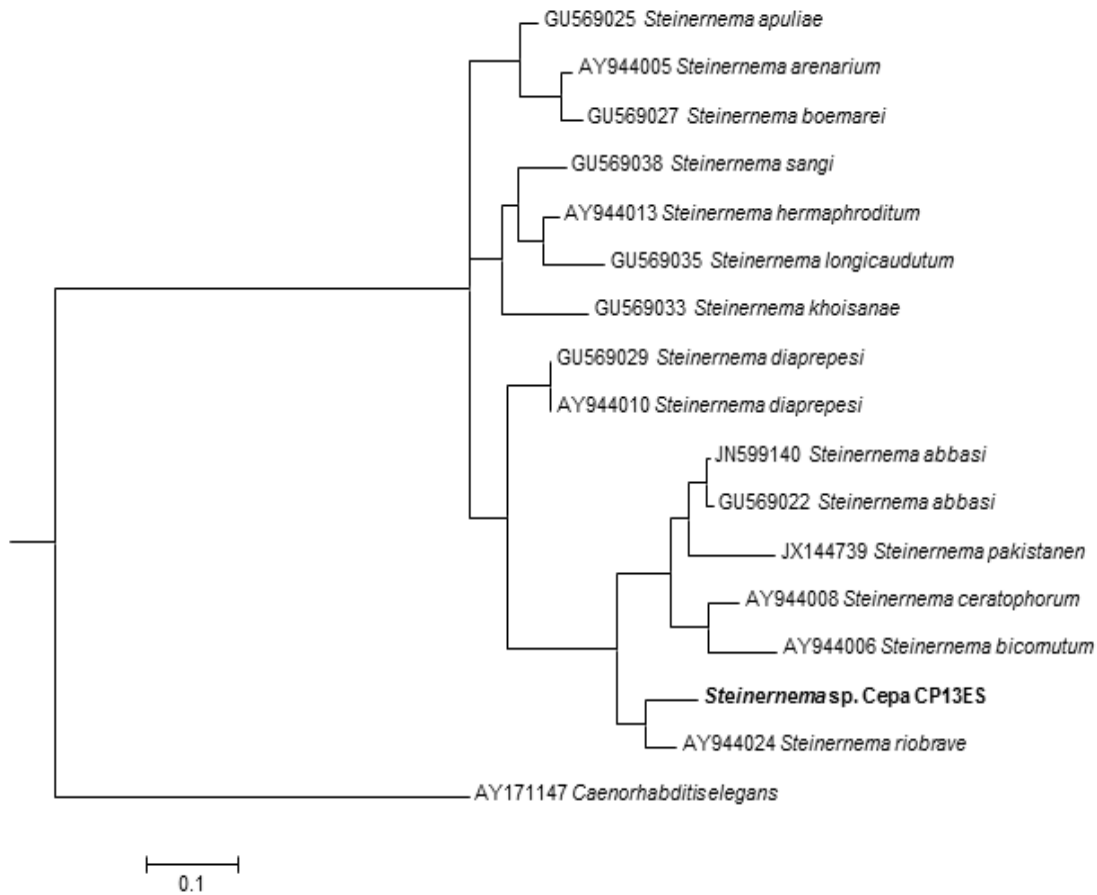


Figura 9. Filogenia construida con base en la región mitocondrial 12S del grupo *bicomutum-ceratophorum-riobrave*, construido con inferencia Bayesiana con Mr Bayes, considerando 1M de generaciones muestreadas cada 100 generaciones. El 25% de los árboles fueron descartados y la probabilidad posterior se determinó con los árboles restantes. Se usó a *C. elegans* como especie fuera de grupo.

### 3.5 Diagnosis

Los datos morfológicos y morfométricos así como el análisis filogenético basado en las secuencias ITS1+5.8S+ITS2, 28S del ADNr y el gen mitocondrial 12S, muestran que se trata de una nueva especie dentro del género *Steinerema*, se

caracteriza por presentar juveniles infectivos (JI) con proyecciones de las papilas labiales laterales en forma de “cuernos”, rasgo que comparte con las especies del mismo grupo filogenético IV (*S. bicornutum*-*S. ceratophorum*-*S. riobrave*) (Spiridonov *et al.*, 2004). Los JI presentan un largo del cuerpo de 410-566  $\mu\text{m}$  ( $498\mu\text{m} \pm 6.5$ ), considerándose los más pequeños dentro del mismo grupo, una anchura del cuerpo de 21-32  $\mu\text{m}$  ( $27\mu\text{m} \pm 0.4$ ) (Cuadro 2). Cutícula con múltiples estrías transversales en todo el cuerpo y campos laterales con un número máximo de 8 incisuras en la parte media del cuerpo. Una característica que separa a esta especie del resto del grupo IV es la presencia de anastomosis de la cutícula en la región ventral, ubicadas después del poro excretor hasta antes del inicio del ano. Las hembras de 1ª y 2ª generación presentan la vulva más allá de la mitad del cuerpo (60%), hembras de 1ª generación con un mucrón al final de la cola. La cola de las hembras de 2ª generación con un hinchamiento en el labio anal posterior. El largo del cuerpo de los machos de 1ª generación a 30°C fluctúa de =1022-1351 $\mu\text{m}$  ( $1145\mu\text{m} \pm 13.8$ ) en relación al largo de la primera generación obtenidos a 25°C =1144-1827 $\mu\text{m}$  ( $1392\mu\text{m} \pm 36.5$ ). Una diferencia de *Steinernema sp.* CP13ES se relaciona con el ancho del cuerpo de los machos, donde a 30°C la anchura máxima es de 62-83 $\mu\text{m}$  ( $69\mu\text{m} \pm 0.8$ ) mientras que a 25°C es de 84-142 $\mu\text{m}$  ( $107\mu\text{m} \pm 2.8$ ) (Cuadro 1). Los machos de segunda generación presentan una espina caudal al término de la cola.

Las hembras de primera generación a 30°C son ligeramente más largas =5996-9832  $\mu\text{m}$  ( $7414\mu\text{m} \pm 195.6$ ) en tamaño en relación a las obtenidas a 25°C =5937-9759  $\mu\text{m}$  ( $6954\mu\text{m} \pm 172$ ), lo que muestra ligeras variaciones corporales (Cuadro 1).

El análisis filogenético mediante secuencias de los genes ribosómicos ITS1 y 28S, conjuntamente con el gen mitocondrial (12S), indican que la nueva especie es miembro del grupo IV, y filogenéticamente cercano a *S. papillatum* y *S. riobrave* (Fig. 7).

### 3.6 Discusión

El análisis filogenético y evolutivo realizado con tres regiones muestran una clara separación de *Steinernema sp.* CP13ES de otras especies del género *Steinernema*, así como la mayor proximidad a la especie encontrada en Venezuela *S. papillatum* (ITS1+5.8S+ITS2) y la de Texas *S. riobrave* (28S y 12S). Al considerar la longitud del cuerpo de los JI de *Steinernema sp.* CP13ES de 410-566  $\mu\text{m}$  ( $498\mu\text{m} \pm 6.5$ ), estos se encuentran más cercanos a *S. bifurcatum* con 460-590  $\mu\text{m}$  ( $521\mu\text{m} \pm 27.3$ ) y a *S. abbasi* con 496-579  $\mu\text{m}$  ( $541\mu\text{m} \pm 2$ ). La presencia de fasmidio también se considera un carácter compartido entre *Steinernema sp.* CP13ES, *S. riobrave* y *Steinernema sp.* CP13ES. Un carácter observado en los JI de *Steinernema sp.* CP13ES fue la presencia de anastomosis en la cutícula de los JI a lo largo del cuerpo en la parte ventral, característica no presente o mencionada para las especies descritas del grupo IV. Los machos de primera generación de *Steinernema sp.* CP13ES son los más pequeños dentro de este grupo, teniendo un largo de 1022-1351  $\mu\text{m}$  ( $1145\mu\text{m} \pm 13.8$ ), seguido de *S. bifurcatum* con 1059-1454  $\mu\text{m}$  ( $1192\mu\text{m} \pm 314$ ) y *S. abbasi* con 900-1500  $\mu\text{m}$  ( $1200\mu\text{m} \pm 189$ ). No obstante en relación al largo de las espículas de los machos de primera generación *Steinernema sp.* CP13ES presenta un tamaño que fluctúa de 67-84  $\mu\text{m}$  ( $75\mu\text{m} \pm 0.79$ ), valores muy cercanos a *S. aciari* con 85 $\mu\text{m}$ , seguido de *S. ceratophorum* 54-90  $\mu\text{m}$  ( $71\mu\text{m} \pm 7$ ) y de *S. bifurcatum* 60-85  $\mu\text{m}$  ( $69\mu\text{m} \pm 7.7$ ). El número total de papilas en los machos de primera generación de *Steinernema sp.* CP13ES es de 22 papilas y una independiente, rasgo compartido con la mayoría de las especies del grupo excepto por *S. goweni* con 27 papilas y una independiente y *S. riobrave* con 24 y una independiente. Los machos de segunda generación son considerados los más pequeños dentro del grupo con 274-392.3  $\mu\text{m}$  ( $347\mu\text{m} \pm 6.4$ ), seguido de *S. bifurcatum* 560-590  $\mu\text{m}$  ( $621\mu\text{m} \pm 46$ ), *S. goweni* 449-1236  $\mu\text{m}$  ( $802\mu\text{m} \pm 216$ ) y *S. ceratophorum* con 727-927  $\mu\text{m}$  ( $835\mu\text{m} \pm 52$ ); mientras que *S. abbasi* presenta machos de segunda generación con 606-1035 $\mu\text{m}$  ( $681\mu\text{m}\pm 121$ ). La terminación de la cola en forma de espina para los machos de segunda generación de *Steinernema sp.* CP13ES es un rasgo no

compartido por ninguna especie descrita para este grupo. Los machos de otras especies presentan o no, un mucrón al final de la cola.

Las hembras de primera generación de *Steinernema sp.* CP13ES presentan un largo de 5996-9832  $\mu\text{m}$  ( $7414\mu\text{m} \pm 195.6$ ), mediciones cercanas a *S. aciari* con 5500-8850  $\mu\text{m}$  ( $7233\mu\text{m} \pm 1013$ ). Sin presencia de epitigma, rasgo compartido con *S. riobrave* y *S. ceratophorum*. La vulva al 60% en relación al largo del cuerpo es una característica no compartida por ninguna especie del grupo, pero cercana a *S. bifurcatum* con 56.6% y *S. goweni* con 55%. Las hembras de segunda generación de *Steinernema sp.* CP13ES son de igual manera las más pequeñas dentro del grupo con 2573-4047  $\mu\text{m}$  ( $3169\mu\text{m} \pm 13.9$ )  $\mu\text{m}$ , seguido de *S. bifurcatum* 994-1749  $\mu\text{m}$  ( $1241\mu\text{m} \pm 403$ ) y *S. bicornutum* 1269-1809  $\mu\text{m}$  ( $1616\mu\text{m} \pm 146$ ), las cuales son más de cuatro o cinco veces su tamaño. Esta generación de hembras para *Steinernema sp.* CP13ES presenta un hinchamiento anal, característica relacionada con *S. abbasi*, *S. yirgalemense*, *S. bifurcatum* y *S. papillatum*. Sin embargo, biológicamente *Steinernema sp.* CP13ES presenta una característica única en relación a todas las especies pertenecientes al grupo IV; la emergencia de los JI a los 6 días a 30°C sin presentar una segunda generación, característica no descrita para el resto de las especies.

Todas las larvas de *G. mellonella* utilizadas para la obtención de las generaciones fueron de tercer instar con tamaños homogéneos (Gouge y Hague, 1995); ya que esta variación podría ocasionar diferencias en tamaños ( $\mu\text{m}$ ) de los NEP's al emerger de los cadáveres (Bastidas *et al.*, 2014; Hazir *et al.*, 2001). Sobre la emergencia temprana de los JI, el único reporte mencionado es el de *S. thermophilum* (Sundershan y Sing, 2000), no obstante características morfológicas y moleculares descartan su parecido biológico (Nguyen y Hunt, 2007; Sundershan y Singh, 2000) con *Steinernema sp.* CP13ES. Por lo tanto se considera que la emergencia de JI a los 6 días en larvas de *G. mellonella* a los 30-35°C es un rasgo característico de esta especie. Se considera que los cambios de temperatura benefician o perjudican a diversas especies de steinernemátidos, resultado de una adaptación térmica a estrategias de sobrevivencia para poder infectar en climas



tropicales (Grewal *et al.*, 1994). A su vez, existen otras especies cuya viabilidad y patogenicidad resultan sumamente favorables en climas fríos (Wright, 1992). Se ha demostrado que al colocar los nematodos bajo diferentes temperaturas, pueden llegar a presentar diferencias en el tamaño (Hazir *et al.*, 2001); sin embargo no se presentaron estas variaciones en esta nueva especie.

### 3.5.1 Observaciones biológicas

Los JI de *Steinernema sp.* CP13ES emergen rápidamente cuando las larvas infectadas son expuestas a temperaturas de 30 a 35°C, se presenta una generación de adultos machos y hembras, y la emergencia de los JI ocurre a los 6 días. Esto permite considerar que *Steinernema sp.* CP13ES es un organismo adaptado a clima caliente, como es el caso del estado de Veracruz, en donde fue aislado y podría representar una especie favorable para el control biológico del salivazo (Hemiptera: Cercopidae).

### 3.5.2 Hibridación cruzada para *Steinernema sp.* CP13ES

Un buen soporte para la separación de especies es el entrecruzamiento con especies relacionadas. En este caso la cruce entre *Steinernema sp.* CP13ES y *Steinernema sp.* México (nueva especie en proceso de publicación); especie filogenéticamente más cercana, no presentó progenie. Siendo que ambas especies fueron obtenidas de suelo del cultivo de caña de azúcar en el estado de Veracruz, México. En el testigo, cuando las dos especies fueron cruzadas entre ellas mismas, los machos y las hembras produjeron progenie.

3.5.3 Clave en base a las características diferenciales para la identificación de nematodos del género *Steinernema* pertenecientes al grupo IV *bicornutum-ceratophorum-riobrave* (Spiridonov et al., 2004)

1. Juveniles infectivos sin papilas laterales cefálicas en forma de “cuernos”.....otros grupos de *Steinernema*.
- 1'. Juveniles infectivos con papilas laterales cefálicas en forma de “cuernos” *Steinernema* grupo IV *bicornutum-ceratophorum-riobrave*.....2
2. Macho de 1ª generación con una anchura del gubernáculo en relación a la región angosta del cuneus (8.1 µm) tan ancho como la parte posterior del corpus.....*Steinernema riobrave* Cabanillas, Poinar & Raulston, 1994
- 2'. Macho de 1ª generación con una anchura del gubernáculo en relación a la región angosta del cuneus (8.1 µm) menor a la parte posterior del corpus.....3
3. Campo lateral con un número máximo de 8 incisuras ubicadas en la parte media de los juveniles infectivos (sólo observables con microscopio electrónico de barrido).....4
- 3.' Campo lateral con un número máximo de 6 incisuras ubicadas en la parte media de los juveniles infectivos.....*Steinernema bicornutum* Tallosi & Ehlers 1995.
4. Machos de 1ª generación con 26 a 27 papilas genitales y una papila en la parte anterior a la cloaca.....*Steinernema goweni* San-Blas, Morales, Portillo, Nermut & Puza, 2015.
- 4'. Machos de 1ª generación con 25 a 22 papilas genitales y una papila en la parte anterior a la cloaca.....5
5. Machos de 1ª generación con bifurcación del gubernáculo en su parte proximal.....*Steinernema bifurcatum* Shaina, Yan, Qiu, Han, Gulsher, Khanum & Javed, 2014.
- 5'. Machos de 1ª generación sin bifurcación del gubernáculo en su parte proximal.....6
6. Juveniles infectivos con presencia de anastomosis en la parte lateral (sólo visto a través de microscopía electrónica de barrido); con un largo del cuerpo menor a 500 µm; hembras de 1ª generación con vulva ubicada al 60%.....*Steinernema* sp. Cepa CP13ES

- 6'. Juveniles infectivos sin presencia de anastomosis en la parte lateral, con un largo del cuerpo mayor a 500  $\mu\text{m}$ , hembras de 1ª generación con vulva ubicada a menos del 60 %.....7
7. Cuerpo de juveniles infectivos mayor a 1000  $\mu\text{m}$ , con una longitud de la cola mayor a 70  $\mu\text{m}$ ; machos de 1ª generación con una longitud de las espículas mayor a 80  $\mu\text{m}$ ; longitud del gubernáculo mayor a 55  $\mu\text{m}$ .....*Steinernema aciari* Qiu, Yan, Zhou, Nguyen, & Pang, 2004.
- 7'. Cuerpo de juveniles infectivos menor a 1000  $\mu\text{m}$ , con una longitud de la cola menor a 70  $\mu\text{m}$ ; y machos de 1ª generación con una longitud de las espículas menor a 80  $\mu\text{m}$ ; longitud del gubernáculo menor a 55  $\mu\text{m}$ .....8
8. Presencia de deiridios prominentes en los machos de 1ª y 2ª generación localizados al nivel del bulbo basal.....*Steinernema papillatum* San-Blas, Portillo, Nermut, Puza, & Morales, 2016.
- 8'. Sin presencia de deiridios prominentes en los machos de 1ª y 2ª generación al nivel del bulbo basal.....9
9. Juveniles infectivos con una terminación de la cola alargada, con una curvatura dorsal en ella, y con una depresión ventral en la punta; hembras de 2ª generación mayor a 2609  $\mu\text{m}$  de longitud; con presencia de mucrón en la cola en el 65% de ellas.....*Steinernema abbasi* Elawad, Ahmad & Reid, 1997.
- 9'. Juveniles infectivos con una terminación de la cola alargada pero sin una curvatura dorsal en ella, sin presencia de una depresión ventral en la punta; hembras de 2ª generación menores a 2609  $\mu\text{m}$  de longitud, sin presencia de mucrón en la cola.....10
10. Machos de 1ª generación con un largo del cuerpo mayor a 1500  $\mu\text{m}$ , con una longitud de la cola igual a 20  $\mu\text{m}$ ; con presencia de mucrón raramente visto en los machos de 2ª generación y presencia de hinchamiento anal en hembras de 2ª generación.....*Steinernema yirgalemense* Nguyen, Tesfamariam, Gozel, Gaugler, & Adams, 2004.
- 10'. Machos de 1ª generación con un largo del cuerpo menor a 1500  $\mu\text{m}$ , longitud de la cola menor a 20  $\mu\text{m}$ ; sin mucrón en los machos de 2ª generación y sin presencia de hinchamiento anal en hembras de 2ª generación.....11
11. Longitud de la cola de los juveniles infectivos menor a 60  $\mu\text{m}$ , longitud de la cola de los machos de 1ª generación igual a 26  $\mu\text{m}$ , con presencia de mucrón en el 10% de ellos;

presencia de epitigma en hembras de 1ª generación y machos de 2ª generación sin mucrón al término de la cola.....*Steinernema pakistanense* Shahina, Rowe, & Maqbbol, 2001.

11'. Longitud de la cola de los juveniles infectivos mayor a 60 µm, longitud de la cola de los machos de 1ª generación mayores a 35 µm, sin mucrón al término de la cola; sin epitigma en las hembras de 1ª generación y machos de 2ª generación con mucrón al término de la cola.....*Steinernema ceratophorum* Jian, Reid, & Hunt, 1997.

## **CAPÍTULO 4. CARACTERIZACIÓN DE *Heterorhabditis indica* (Poinar et al., 1992), CEPA CP13JA**

### 4.1 Machos

Región anterior redondeada, con seis papilas labiales ubicadas alrededor de la boca. Queilorabdions ligeramente visibles en la región del estoma. Esófago tipo rabadiforme alargado, itsmo delgado. Anillo nervioso justo en la parte media del itsmo. Anfidios localizados cerca de las papilas labiales. Poro excretor cerca de la base del inicio del bulbo esofágico. Presencia de un testículo simple y reflejado; espículas pareadas y separadas, con terminación en punta. Gubernáculo plano, estrecho, aproximadamente a la mitad de la longitud de las espículas. Bursa pelodera, abierta, soportada por siete pares de papilas; tres pares precloacales, un par adcloacal y tres pares postcloacales (Fig. 10 A).

### 4.2 Hembras

Hembras en forma de C cuando mueren por calor, región anterior ligeramente redondeada con una continuidad en el cuerpo. Región oral con papilas labiales evidentes, anfidios localizados cerca de la zona oral. Esófago alargado, con un itsmo evidente y angosto el cual ésta rodeado en su parte media por el anillo nervioso, bulbo esofágico redondeado, evidente. Poro excretor usualmente posterior al bulbo basal. Vulva estrecha, ubicada al 50% con respecto a la longitud total del cuerpo. Presentan ovarios reflejados, anfidélficos. El labio posterior de la región anal sobresaliente (Fig. 10 B), cola con terminación cónica en punta.

### 4.3 Juveniles infectivos

Cuerpo alargado y delgado, tercer juvenil cubierto con la cutícula del J2. Región anterior redondeada (Fig. 10 C). Boca y ano cerrados, no funcionales. Región

labial con un diente dorsal. Mediante microscopia de luz se observa en la parte anterior una porción hialina evidente, conformada por la cutícula del J2. Cutícula ornamentada con estrías longitudinales desde la primera porción del cuerpo hasta el término de la cola. Hemizonidio evidente y situado anterior al poro excretor. Cola alargada con terminación ligeramente en punta (Fig. 10 D).

#### Localidad y hospedero

Los nematodos fueron colectados a partir de muestras de suelo en el ingenio la Gloria, municipio Úrsulo Galván, localidad Jareros (19°14'N, 98°18'W; 20 msnm), perteneciente al estado de Veracruz, México. El tipo de hospedero de estos nematodos en la naturaleza es desconocido, ya que fue recuperado de suelo mediante larvas de *G. mellonella*.

#### 4.4.1 Etimología

*Heterorhabditis indica* aislamiento CP13JA, es nombrado por el Colegio de Postgraduados (CP), institución en la que se realizó la investigación, el año en que se encontró (2013), y la localidad en que fue colectada la especie (Jareros).

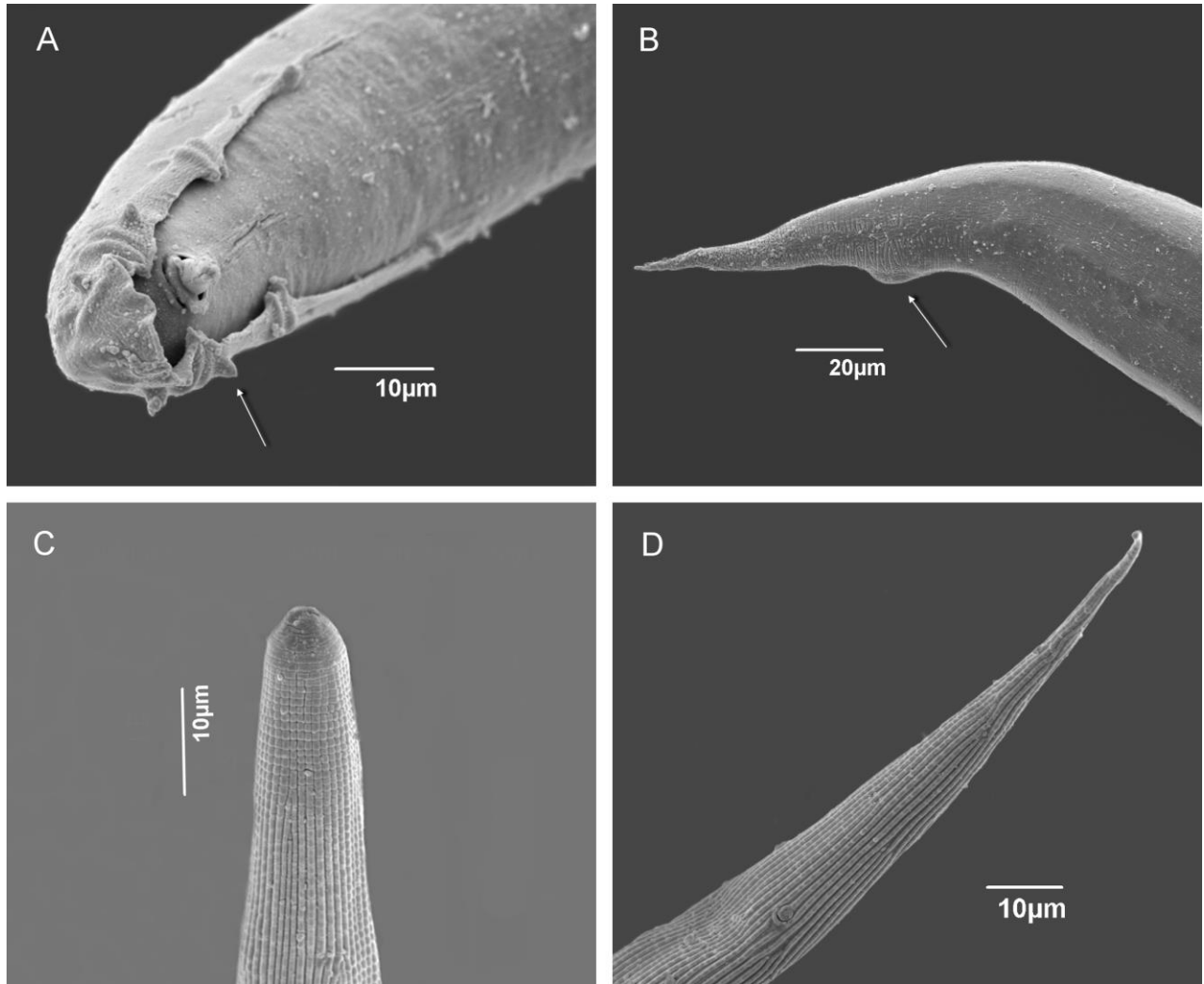


Figura 10. *Heterorhabditis indica* (CP13JA); A, bursa de machos mostrando la disposición de los radios caudales. B, hinchamiento anal en la región posterior de hembras de segunda generación. C y D, juveniles infectivos: C, región anterior y, D, región posterior con terminación de la cola en punta.

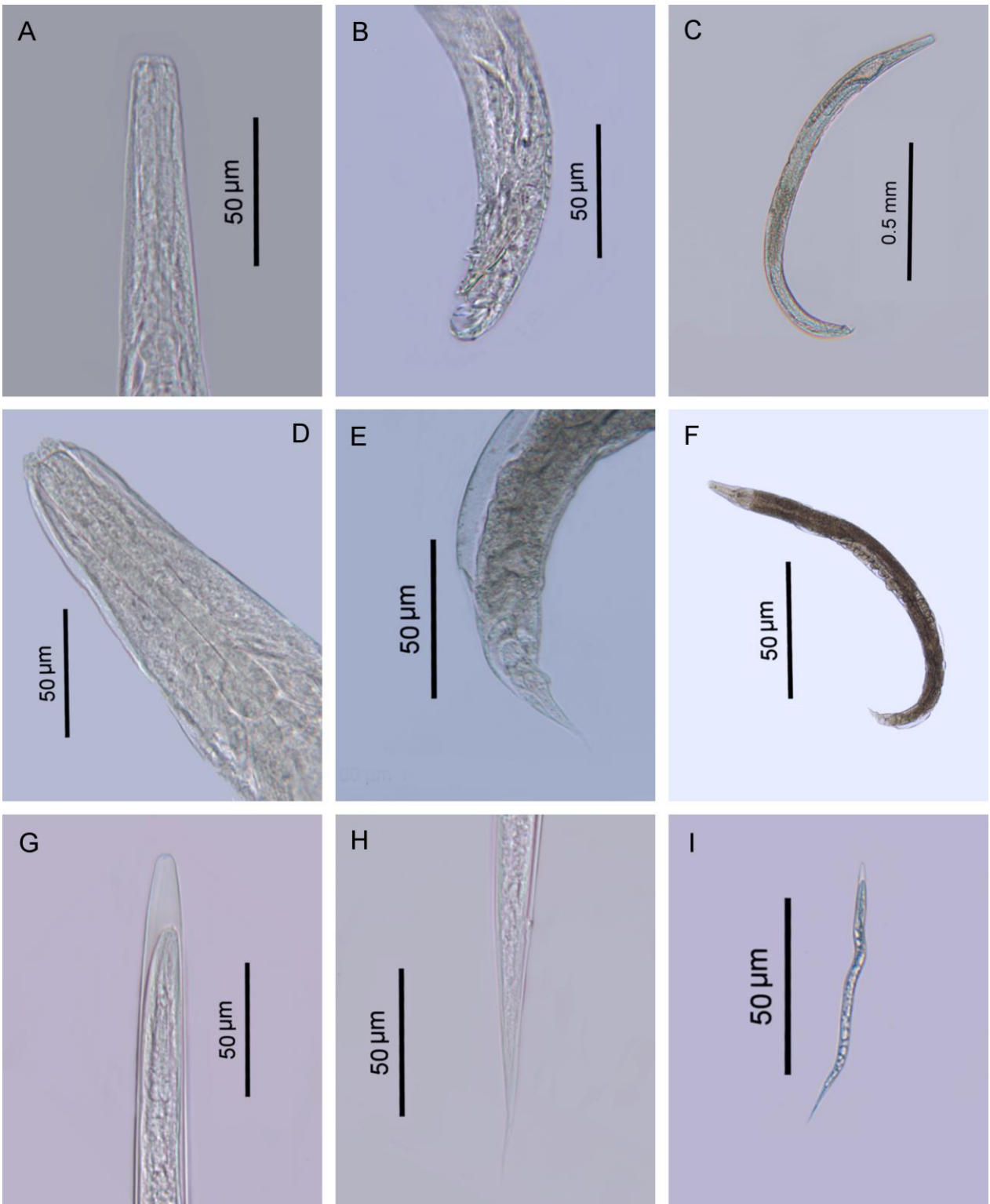


Figura 11. *Heterorhabditis indica* cepa CP13JA. Microscopía de luz. A, B y C, machos de segunda generación: A, región anterior, B, región posterior, C, cuerpo completo de macho de segunda generación; D, E y F, hembras de segunda generación: D, región anterior, E, región posterior, F, cuerpo completo de hembra de segunda generación; G, H, e I, juveniles infectivos; G, región posterior, H, región anterior, I, cuerpo completo de juveniles infectivos.



Cuadro 4. Comparación morfométrica de machos y hembras de segunda generación, y juveniles infectivos del aislamiento *Heterorhabditis indica* (CP13JA) y *H. indica* (Poinar Jr., 1992). Indicando promedio, error estándar, así como el mínimo y máximo de las medidas obtenidas. N= número de especímenes medidos. TBL= ancho total del cuerpo, MBW= anchura media del cuerpo, EP= distancia de la región al poro excretor, NR= distancia de la región anterior al anillo nervioso, ES= largo total del esófago, TL= largo de la cola, ABW= anchura media del ano, SpL= largo de las espículas, GuL= largo del gubernáculo.

<i>Heterorhabditis indica</i> (CP13JA)				<i>Heterorhabditis indica</i> (Poinar Jr. 1992)		
Segunda generación	Machos	Hembras	Juveniles infectivos	Machos	Hembras	Juveniles infectivos
<b>Carácter</b>						
N	30	30	30	12	12	25
TBL	765±12 (614-944)	1850±30 (1522-2125)	508±4.3 (451-545)	724±64 (573-788)	1600±0.1 (1200-1800)	528±26 (279-573)
MBW	42±0.8 (29-49)	117±2.8 (91-145)	21±0.3 (17-24)	42±7 (35-46)	95±15 (76-113)	20±6 (19-22)
EP	108±1.2 (95-119)	130±1.5 (102-148)	96±1.7 (71-111)	123±7 (109-138)	127±4 (118-138)	98±7 (88-107)
NR	75±0.9 (65-82)	90±1.2 (74-102)	77±1.3 (62-93)	75±4 (72-85)	94±4 (88-96)	82±4 (72-85)
ES	101±1.2 (87-113)	127±1.4 (102-140)	97±1.4 (82-108)	101±4 (93-109)	131±4 (120-139)	117±3 (109-123)
TL	25±0.7 (20-34)	76±1.5 (60-88)	89±1.7 (72-101)	28±2 (24-32)	76±9 (66-88)	101±6 (93-109)
ABW	20±0.3 (15-23)	27±0.5 (22-32)	21±0.3 (19-26)	23±8 (19-24)	26±11 (22-32)	9.1±4 (8-10)
SpL	40.8±1 (31-48)			43±3 (35-48)		
GuL	19±0.4 (15-24)			21±3 (18-23)		
a=TBL/MBW	18	16	24	17	17	26
b=TBL/ES	8	14	5	7	12	4
c = TBL/TL	31	24	6	26	21	5
D%= EP/ESx100	107	102	99	122	97	84
E%= EP/TLx100	435	172	108	439	16	97
SW= SpL/ABWx100	206			187		
GS= GuL/SpLx100	48			49		

#### 4.4.2 Especímenes tipo

Los especímenes fueron depositados en CNHE (Colección Nacional de Helmintos, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México); y en la colección nematodos del Colegio de Postgraduados México (CPNC).

#### 4.4.3 Caracterización molecular

La cepa *H. indica* (CP13JA) localizada en Veracruz muestra una relación inmediata a poblaciones de *Heterorhabditis indica* descritas por otros autores y en diferentes regiones del mundo.

#### 4.5 Discusión

A través de los estudios morfológicos y morfométricos (Cuadro 4) *H. indica* cepa CP13JA obtenida en el estado de Veracruz, México, se identifica como la especie *H. indica* descrita anteriormente por [Poinar Jr. et al \(1992\)](#). El análisis molecular de la región ITS1+5.8S+ITS2 mostró un parentesco inmediato con otras especies de *H. indica* encontradas en la plataforma del NCBI. Se encontraron ligeras variaciones con la especie original de *H. indica* descrita por [Poinar](#), como el largo de los JI donde la cepa CP13JA mide 451-545 ( $508\mu\text{m} \pm 4.3$ ) y *H. indica* 279-573 ( $528\mu\text{m} \pm 26$ ). El largo del cuerpo de los machos de la cepa CP13JA 614-944 ( $765\mu\text{m} \pm 12.4$ ) y el de *H. indica* 573-788 ( $724\mu\text{m} \pm 64$ ); el ancho del cuerpo en la región media de las hembras de segunda generación para la cepa CP13JA es 91-145 ( $117\mu\text{m} \pm 2.8$ ) y el de *H. indica* 76-113 ( $95\mu\text{m} \pm 15$ ). La presencia de *H. indica* dentro del cultivo de caña de azúcar en México, sugiere que esta especie posee caracteres fenotípicos que permiten su prevalencia en zonas con clima cálido-tropical, lo cual favorece su adaptación a altas temperaturas, tolerancia a la desecación y habilidad para la dispersión ([Stack et al., 1999](#)). *H. indica* CP13JA se considera un aislamiento nuevo para México en el cultivo de caña de azúcar, a pesar de que esta especie presenta una distribución mundial a través del trópico y subtropical; en países como Kenia, Cuba, Indonesia, Australia, Jamaica, USA y México ([Meza-García et al., 2014](#), [Sánchez-Saavedra et al., 2012](#); [Stack et al., 1999](#)).

#### 4.6 Conclusión

Los estudios realizados en esta investigación permiten considerar a *Steinernema* sp. CP13ES como una nueva especie, integrante del grupo IV. Se considera que la emergencia de los J1 a los 6 días a 30°C es un carácter único para esta especie. La detección de *H. indica* para el cultivo de caña de azúcar en el estado de Veracruz, es considerado nuevo a pesar de que esta misma especie ha sido detectada en otras partes de México. La presencia de estos dos nematodos en el cultivo de la caña de azúcar, dan la pauta para proponer su utilización como agentes de control biológico en regímenes de temperaturas y humedades altas, para infectar y reducir poblaciones del salivazo en caña de azúcar.

#### 4.7 Literatura Citada

- Bastidas, B., E. Portillo, and E. San-Blas. 2014. Size does matter: The life cycle of *Steinernema* spp. in micro-insect hosts. *Journal of Invertebrate Pathology* 121: 46-55.
- Bedding, R. A., and R. J. Akhurst. 1975. A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid in soil. *Nematologica* 21: 109-110.
- Cabanillas, H. E., G. O. Poinar Jr., and J. R. Raulston. 1994. *Steinernema riobravis* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae) from Texas. *Fundamentals of Applied Nematology*. 17: 123-131.
- Castillo Z. S. 2006. Uso de *Metarhizium anisopliae* para el control biológico del salivazo (*Aeneolamia* spp. y *Prosapia* spp.) en pastizales de *Brachiaria decumbens* en El Petén, Guatemala. Tesis Magister Scientiae en Agricultura Ecológica. Turrialba, Costa Rica. 67.
- Cid Del Prado-Vera, I., H. Ferris, and S. A. Nadler. 2010. Soil inhabiting nematodes of the genera *Trischistoma*, *Tripylina* and *Tripyla* from Mexico and

- the USA with descriptions of new species. *Journal of Nematode Morphology and Systematics*, 13: 29-49.
- CONADESUCA, 2011. Diagnóstico del Campo Cañero, Capítulo: Plagas y Enfermedades. Estado de atención en los ingenios.
- De Paula Batista, E., and A. A. Machado. 2010. Application methods of entomopathogenic nematodes for control of *Mahanarva spectabilis* (Hemiptera: Cercopidae). *Biocontrol Science and Technology* 20: 1079-1085.
- Edgar, R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high. *Nucleic Acid Research*. 32: 1792-1797.
- Eisenback, J. D. 1991. Preparation of nematodes for scanning electron microscopy. Part. 2 of: Methods for collection and preparation of nematodes. *In: Nickle W. R. (ed.) Manual of Agricultura Nematology*. Marcel Dekker. Nueva York. p. 87-96.
- Elewad, S., W. Ahmad, and A. P. Ried. 1997. *Steinernema abbasi* sp. n. (Nematoda: Steinernematidae) from the Sultanate of Oman. *Fundamentals Applied Nematology*. 20: 435-442.
- Enríquez, Q. J. F., N. F. Meléndez y A. E. D. Bolaños. 1999. Tecnología para la Producción y Manejo de Forrajes Tropicales en México. INIFAP. CIRGOC. Campo Experimental Papaloapan. Libro Técnico No. 7. Veracruz, México. 262p.
- Ferrer, F., M. Arias, A. Trelles, G. Palencia, J. M. Navarro y R. Colmenares. 2004. Posibilidades del uso de nematodos entomopatógenos para el control de *Aeneolamia varia* en caña de azúcar. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)*, 72: 39-43.
- Ferri, E., M. Barbuto, O. Bain, A. Galimberti, U. Shigehiko, R. Guerrero, H. Ferte, C. Bandi, C. Martin, and M. Casigari. 2009. Integrated taxonomy: traditional approach and DNA barcoding for the identification of filaroid worms and related parasites. *Frontiers in Zoology*, 6: 1.

- Gouge, D. H., and N. G. M. Hague. 1995. The development of *Steinernema feltiae* (Nematoda: Steinernematidae) in the sciarid fly *Bradysia paupera* (Diptera: Sciaridae). *Annals Applied Biology*, 126: 395-401.
- Grewal, P. S., S. Selvan, and R. Gaugler. 1994. Thermal adaptation of entomopathogenic nematodes: niche breadth for infection, establishment, and reproduction. *Journal of Thermal Biology*, 19: 245-253.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids. Symposium Series*, 41: 95-98.
- Hazir, S., P. S. Stock, H. K. Kaya, A. M. Koppenhöfer, and N. Keskin. 2001. Developmental Temperature Effects on Five Geographic Isolates of the Entomopathogenic Nematode *Steinernema feltiae* (Nematoda: Steinernematidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 77: 243-250.
- Henneberry, T. J., L. F. Jerch, R. A. Burke, and J. E. Lindegren. 1996. Temperature effects on infection and mortality of *Pectinophora gossypiella* (Lepidoptera: Gelechiidae) larvae by two entomopathogenic nematodes species. *Environmental Entomology*, 25: 179-183.
- Hernández-Rosas, F., N. I. Ventura- Benítez, M. R. Pérez-Fernández, y N. Real-Luna. 2007. Manejo sustentable del agroecosistema caña de azúcar: Caso barrenador del tallo en Paso del Macho, Veracruz. XXX Congreso Nacional de Control Biológico-Simposio del IOBC, Mérida, Yucatán.
- Howlett, B. J., A. G. Brownlee, D. I. Guest, G. J. Adcock, and G. I. Mc Fadden. 1992. The 5S ribosomal RNA gene is linked to large and small subunit ribosomal-RNA genes in the oomycetes, *Phytophthora vignae*, *P. cinnamomi*, *P. megaspera* f. sp. *glycinae* and *Saprolegnia ferax*. *Current Genetics*, 22: 455-461.
- Jian, H., A. P. Reid, and D. J. Hunt. 1997. *Steinernema ceratophorum* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from north-east China. *Systematic Parasitology*, 37: 115–125.

- Joyce, S.A., A. Reid, F. Driver, and J. Curran. 1994. Application of polymerase chain reaction (PCR) methods to the identification of entomopathogenic nematodes, In: Burnell, A. M., R. U. Ehlers, and J. P. Masson, (Eds). *Biotechnology: Genetics of Entomopathogenic Nematodes Bacterium Complexes*. Proceedings of Symposium and Workshop, St Patrick's College, Maynooth, County Kildare, Ireland. Luxembourg, European Commission, DGXII, pp. 178-187.
- Nguyen, K. B., and D. J. Hunt. 2007. *Entomopathogenic Nematodes: Systematics, Phylogeny and Bacterial Symbiosis*. Nematology Monographs and Perspectives. Edt. Brill. ISBN-10:978 90 04 15293 9. pp. 123-132.
- Nguyen, K.B., and G. C. Smart Jr. 1995. Scanning electron microscope studies of *Steinernema glaseri* (Nematoda: Steinernematidae). *Nematologica* 41: 183-190.
- Poinar Jr. O. G. and L. Blas. 1985. *Hexamermis dactylocercus* sp. n. (Mermithidae: Nematoda), a parasite of *Aeneolamia varia* (Cercopidae: Homoptera) in Venezuela. *Revue du Nématologie*. 8: 109-111.
- Poinar Jr., O. G., G. K. Karunakar, and D. Hastings. 1992. *Heterorhabditis indica* n. sp. (Rhabditida: Nematoda) from India: Separation of *Heterorhabditis* spp. by infective juveniles. *Fundamentals of Applied Nematology*, 15: 467-472.
- Kumar S., N. Masatoshi, J. Dudley and K. Tamura. 2008. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics*, 9: 299-306.
- Leite, L. G., A. L. Machado, M. R. Goulart, M. F. Tavares, and F. A. Batista. 2005. Screening of entomopathogenic nematodes (Nemata: Rhabditida) and the efficiency of *Heterorhabditis* sp. against the sugarcane root spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Fabr.) (Hemiptera: Cercopidae). *Neotropical Entomology*. 34: 785-790.
- Meza-García, J. L., M. Elías-Santos, E. Cortez-Mondaca, M. Guerrero-Olazarán, J. M. Viader-Salvadó, H. A. Luna-Olvera, M. G. Maldonado-Blanco, I. Quintero-

- Zapata and B. Pereyra-Alfárez. 2014. Evaluation of *Heterorhabditis indica* (Rhabditida: Heterorhabditidae) nematode strain from Sinaloa, Mexico, against *Bemisia tabaci* immatures under laboratory conditions. *Southwestern Entomologist*, 39:727-738.
- Nguyen K. B., M. Tesfamariam, U. Gozel, R. Gaugler, and J. A. Byron. 2004. *Steinernema yirgalemense* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae) from Ethiopia. *Nematology*, 6: 839-856.
- Qiu, L. X. Yan, Y. Zhou, K. B. Nguyen, and Y. Pang. 2004. *Steinernema aciari* sp. n. (Nematoda: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Guangdong, China. *Journal of Invertebrate Pathology*, 88: 58-69.
- Ronquist, F. and J. P. Huelsenbeck. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19: 1572-1574.
- San-Blas, E., P. E. Portillo, J. Nermut, V. Puza, and Morales-Monteiro. 2015. *Steinernema papillatum* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Venezuela. *Nematology* 17: 1081-1097.
- San-Blas, E., P. Morales-Monteiro, E. Portillo, J. Nermut, and V. Puza. 2016. *Steinernema goweni* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Zulia State, Venezuela. *Zootaxa* 4067: 200-214.
- Sanchez-Saavedra, M. G., H. Cortez-Madriral, y D. Cristóbal-Acevedo. 2012. infectividad de *Heterorhabditis indica* (Rhabditida: Heterorhabditidae) en adultos y larvas de gallina ciega (Coleoptera: Melolonthidae). *Revista Chapingo Serie Horticultura* 18: 383-394.
- Seinhorst, J. W. 1959. A rapid method for the transfer of nematodes from fixative to anhydrous glycerin. *Nematologica*, 4: 67-69.
- Shahina, F. M. Anis, A. P. Reid, J. Rowe, and Maqbool. 2001. *Steinernema pakistanense* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae) from Pakistan. *International Journal of Nematology*, 11: 124-133.

- Shahina, F., Y. Xun, Q. Lihong, H. Richou, G. Mehreen, A. K. Tabassum, and J. Salma. 2014. A new entomopathogenic nematode, *Steinernema bifurcatum* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae) from Punjab, Pakistan. *Nematology*, 16: 821-836.
- Stack, C. M., S. G. Easwaramoorthy, U. K. Metha, M. J. Downes, C. T. Griffin, and A. M. Burnell. 1999. Molecular characterization of *Heterorhabditis indica* isolates from India, Kenya, Indonesia and Cuba. *Nematology*, 2: 477-487.
- Sturhan D., and Z. Mracek. 2000. Comparison of the *Galleria* baiting technique and a direct extraction method for recovering *Steinernema* (Nematoda: Rhabditida) infective-stage juveniles from soil. *Folia Parasitologica*, 47: 315-318.
- Sudershang, G., and L. K. Sing. 2000. *Steinernema thermophilum* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae) from India. *International Journal of Nematology*, 10: 183-191.
- Spiridonov, S. E., A. P. Reid, K. Podrucka, S. A. Subbotin, and M. Moens. 2004. Phylogenetic relationships within the genus *Steinernema* (Nematoda: Rhabditida) as inferred from analyses of sequences of the ITS1-5.8S-ITS2 region of rDNA and morphological features. *Nematology*, 6: 547-566.
- Stock, S. P., J. F. Campbell, and S. A. Nadler. 2001. Phylogeny of *Steinernema* Travassos, 1927 (Cephalobina: Steinernematidae) inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters. *Journal of Parasitology*, 87: 877-889.
- Tallosi, B., and R. Ehlers. 1995. *Steinernema bicornutum* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae) from Vojvodina, Yugoslavia. *Russian Journal of Nematology* 3:71-80.
- Thompson, V., y León G., R. 2005. La identificación y distribución de los salivazos de la caña de azúcar y los pastos (Homoptera: Cercopidae) en Costa Rica. *Revista Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*. 75: 43-51.
- White, G. F. 1927. A method for obtaining infective nematode from cultures. *Science*, 66: 302-303.



- Wilcox, D., B. Dove, D. McDavid and D. Greer. 2002. Image tool. Version 3.0. San Antonio: Health Science Center/ University of Texas.
- Woodring, L. J., and H. K. Kaya. 1988. Steinernematid and Heterorhabditid nematodes: A handbook of biology and techniques. Arkansas Agricultural Experiment Station. Fayetteville, Arkansas, USA. pp. 1-29.
- Wright, P. J. 1992. Cool Temperature reproduction of Steinernematid and Heterorhabditid nematodes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 60: 148-151.
- Zhang, Z., S. Schwartz, L. Wagner and W. Miller. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal Computational Biology*.7:203-14.

# CAPÍTULO 5. CONTROL DEL SALIVAZO (HEMIPTERA: CERCOPIDAE) EN CAÑA DE AZÚCAR CON DOS ESPECIES NATIVAS DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS EN MÉXICO

## RESUMEN

El salivazo o mosca pinta (*Aeneolamia* spp. y *Prosapia* spp.; Hemiptera: Cercopidae) es una plaga importante de la caña de azúcar, con altas incidencias en el estado de Veracruz, México. El control de estos insectos requiere de nuevas alternativas al uso de insecticidas. En este estudio se investigó la infectividad de dos cepas nativas de nematodos entomopatógenos (NEP), *Heterorhabditis indica* y *Steinernema* sp., conjuntamente con el agente dispersante Break-Thru<sup>®</sup>, a ninfas de salivazo. Los NEP fueron aislados de muestras de suelo en cultivos de caña de azúcar en esta región. Los experimentos fueron realizados en dos áreas que abastecen a los ingenios Constanca y Potrero. El primer ensayo consistió en la aplicación de las dos cepas de NEP más el dispersante, con el fin de seleccionar la cepa más apropiada. En el segundo ensayo se evaluó solamente la cepa de *Steinernema* sp. + dispersante, y se evaluó la sobrevivencia de los insectos en unidades muestrales de 1 m<sup>2</sup> con cepa al centro. En ambos experimentos se consideraron cuatro repeticiones por tratamiento. En el primer experimento ambas cepas de NEP causaron una mortalidad moderada de 73% para *H. indica* y 62% para *Steinernema* sp. No hubo diferencias significativas en la mortalidad causada por las dos cepas, pero fueron diferentes respecto al control con agua + dispersante ( $p = 0.0150$ ). En el segundo experimento, al aplicar la cepa de

*Steinernema* sp. y evaluarla a través del tiempo, ésta mantuvo significativamente bajas las poblaciones del salivazo ( $p = 0.249$ ); mientras que las poblaciones de ninfas se duplicaron en el testigo al cuarto día de su evaluación. Este estudio demostró la efectividad de *Heterorhabditis indica* y *Steinernema* sp., como agentes de control biológico de ninfas de salivazo.

*Palabras clave:* Bioinsecticida, Control biológico, Nematodos entomopatógenos, Salivazo.

## 5.1 Introducción

El salivazo o mosca pinta (Hemiptera: Cercopidae) es una plaga importante en el cultivo de caña de azúcar (Bustillo *et al.*, 2011). Se distribuye de 0 a 3000 metros sobre el nivel del mar, desde el sureste de los Estados Unidos de América hasta el noreste de Argentina (Peck *et al.*, 2001). En varias regiones se presenta como un complejo de especies, según las condiciones microambientales en donde se desarrolle. En el estado de Veracruz, México, el complejo plaga es representado por los géneros *Aeneolamia* spp. y *Prosapia* spp., donde presenta altas incidencias. Esta plaga representa un serio problema en la producción de la sacarosa, su daño causa reducciones estimadas de hasta 70%, con pérdidas monetarias que fluctúan de 840 a 2100 millones de dólares anuales (Thompson, 2004). Las ninfas de salivazo se caracterizan por la producción de una sustancia con apariencia de saliva, que se produce cuando el insecto se alimenta de las

raicillas superficiales de la base de la caña de azúcar (Gómez, 2007). La “saliva” protege a los estados ninfales de enemigos naturales y ofrece un microclima favorable para su desarrollo (Calderón *et al.*, 1982).

Entre los métodos implementados en el control de esta plaga en México, se encuentran el uso de insecticidas contra adultos y ninfas, las trampas verdes pegajosas contra adultos, el uso de rastra fitosanitaria para la exposición de huevecillos a la desecación y la aplicación del hongo *Metarhizium anisopliae* contra adultos. A pesar de su uso limitado, los nematodos entomopatógenos (NEP) han demostrado ser efectivos en el control de distintas plagas de la caña de azúcar, incluyendo gallinas ciegas (Coleoptera: Scarabaeidae) (Sánchez-Saavedra *et al.*, 2012), termitas (Blattodea) (Mankowski *et al.*, 2005), trips (Thripidae) (Pillay *et al.*, 2009) y el salivazo (Leite *et al.*, 2005; Moreno-Salgero *et al.*, 2012). Sin embargo, entre los pocos estudios referentes al uso de cepas nativas de NEP en el control del salivazo en caña de azúcar (Moreno-Salgero *et al.*, 2012; Pillay *et al.*, 2009), ninguno se ha elaborado en México. Estudios realizados por Leite *et al.*, (2005) indican que diferentes cepas de *Heterorhabditis* pueden ocasionar de 96 a 100% de mortalidad a ninfas de *Mahanarva fimbriolata* y cepas de *Steinernema* de 50 a 98% de mortalidad a los cinco días de la aplicación. Estos mismos géneros fueron evaluados contra *Mahanarva spectabilis* bajo condiciones de invernadero durante 7 días por Batista *et al.* (2014), con mortalidades de 57% para *S. riobrave* y *S. feltiae*. En ambos casos, los autores indican que los NEP pueden ser usados para el control del salivazo en esquemas de manejo integrado de plagas (MIP) (Batista *et al.*, 2014). Por lo que se considera

importante la selección de una cepa virulenta nativa de NEP para ser incluida en programas de MIP contra el salivazo en Veracruz. En este estudio investigamos la capacidad patogénica de dos cepas nativas de NEP, *Steinernema* sp. (CP13CE) y *Heterorhabditis indica* (CP13JA) en ninfas cercanas al tercer instar del complejo *Aeneolamia* spp. y *Prosapia* spp., en dos parcelas de caña de azúcar de la región Central de Veracruz, México.

## 5.2 Materiales y Métodos

### 5.2.1 Cepas de NEP utilizados y forma de aplicación

En este estudio se utilizaron dos cepas nativas de nematodos entomopatógenos, *Steinernema* sp. (CP13CE) y *Heterorhabditis indica* (CP13JA). Las cepas se colectaron de suelo en cultivos de caña de azúcar de la localidad Estrella, municipio de Tezonapa (18°36" N, 96°41" W, 220 msnm) y la localidad Jareros, municipio de Úrsulo Galván (19°14" N, 96°18" W, 20 msnm), en el estado de Veracruz de Ignacio de la Llave, México en el año 2013. Los NEP fueron propagados en larvas de *G. mellonella* (L.). Los juveniles infectivos (JI) que emergieron de los cadáveres fueron cosechados, desinfectados y almacenados en papel filtro (25x27 cm) humedecido. Cada papel filtro / placa, mantuvo una concentración de  $1 \times 10^7$ . Se colocaron en bolsas plásticas con cierre hermético y fueron almacenadas a 4° C antes de su traslado a campo.

Para la aplicación de los tratamientos, las placas de cada aislamiento de NEP se colocaron en recipientes individuales de plástico de 15 L de capacidad, en cada

recipiente se agregaron 8 L de agua con 30 mL ha<sup>-1</sup> del coadyuvante BREAK-THRU® (Bayer) con la finalidad de que se mantuviera una homogenización de los NEP y éstos no se adhirieran a las paredes de las mochilas de aplicación. En seguida la placa de NEP se colocó dentro del recipiente y se agitó vigorosamente por 3 min para liberar los JI del papel filtro. La suspensión se vertió en mochilas de aspersión con capacidad de 20 L. Se aplicaron 19 L de la suspensión en los 144 m<sup>2</sup> de las cuatro repeticiones por localidad, donde se aplicaron 16,500 JI/m<sup>2</sup>. Para no estresar ni dañar a los NEP al momento de ser aplicados se vaciaron en forma independiente en mochilas de aspersión con capacidad de 20 L; se utilizaron boquillas de abanico con aberturas mayores a 500 µm, a una presión de 80 lb pulg<sup>-2</sup> (Shapiro-Ilan *et al.*, 2006). El testigo consistió en la aplicación de 19 L de agua más el dispersante Break-Thru® a una dosis de 30 ml ha<sup>-1</sup>.

### 5.2.2 Características de los sitios experimentales

Las parcelas utilizadas en los ensayos se seleccionaron con base en las siguientes características: a) tener suelos sin problemas de anegamiento, b) demostrar altas infestaciones de la plaga, y c) no haber recibido aplicaciones de plaguicidas, al menos un mes antes del experimento. Los NEP se aplicaron durante los años 2014 y 2015 en agosto y septiembre, durante los picos de población más altos de la plaga (García-García *et al.* 2006). El suelo de cada parcela se caracterizó mediante una muestra combinada por cada localidad, conformada por nueve submuestras de suelo colectadas a una profundidad de 10

cm y distribuidas sistemáticamente en toda el área. Las submuestras fueron almacenadas y refrigeradas a 4° C hasta su análisis.

### 5.2.3 Condiciones ambientales previas y durante la aplicación

Previo a las aplicaciones en campo, se evaluaron las condiciones ambientales prevalentes para la zona de Córdoba, Veracruz (18°53'24"N, 96°55'23"W, 852 msnm) según el Servicio Meteorológico Nacional (smn.conagua.gob.mx). A través de la página web del SMN se determinaron las horas propicias donde la humedad relativa (HR) ambiental permanecería entre 98 y 100%, y las horas con radiación solar mínima (6:00 am en el experimento uno y 7:00 pm en el experimento dos). Para favorecer la sobrevivencia y el desplazamiento de los nematodos, el suelo en cada uno de los ensayos fue asperjado durante 20 min con 80 L de agua por sitio, antes y después de la aplicación de los tratamientos (Cabanillas y Raulston, 1994; Yadav y Lalramliana, 2012). El punto de rocío se presentó a las 6:00 am, hora en que se inició la aplicación de los tratamientos para el primer ensayo. El segundo experimento se realizó a las 7:00 pm, hora sin radiación solar y humedad relativa alta, lo que evitó la exposición directa a los rayos UV; con lo que se buscó aumentar la sobrevivencia de los JI. Para verificar que las condiciones del suelo fueran favorables para la aplicación de los NEP, se utilizó un higrómetro por sitio.

### 5.3 Ensayo 1: Aplicación en campo de *Steinernema* sp. cepa CP13ES y *Heterorhabditis indica*

El primer experimento se realizó en el año 2014, en cuatro localidades del estado de Veracruz, México. La información relativa a las localidades, ingenios y variedades se presenta en el Cuadro 5. Cada parcela experimental consistió en tres surcos de 10 m de largo y 1.20 m de ancho cada uno (Figura 11); para evitar contaminación cruzada el área donde se aplicó la solución de NEP fue de 4 x 2.40 m largo/ancho (Figura 12).

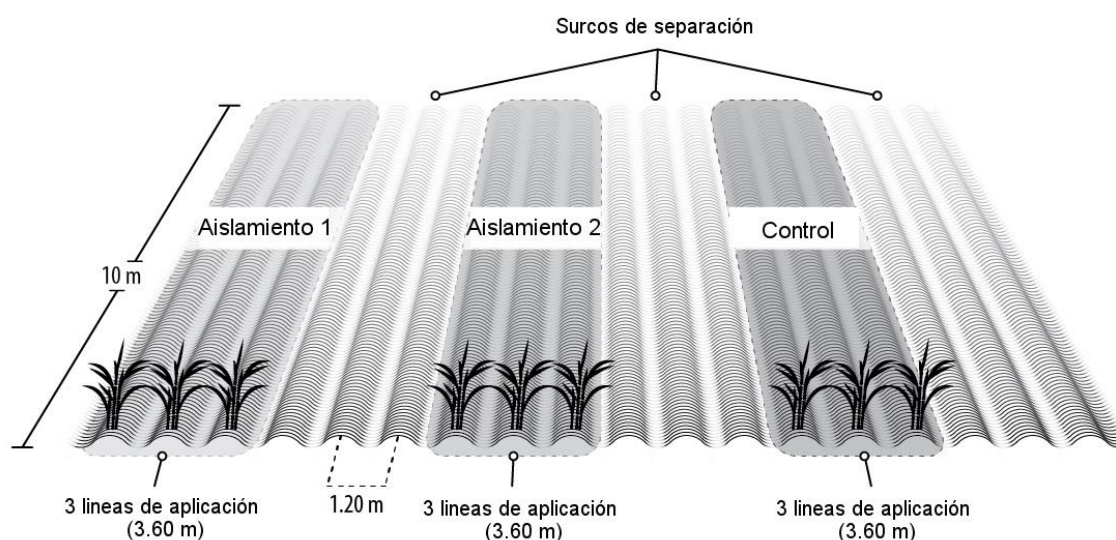


Figura 12. Distribución de tratamientos de nematodos entomopatógenos contra ninfas de salivazo en una repetición del experimento de caña de azúcar. Se muestra el tamaño de parcelas y la separación entre tratamientos.



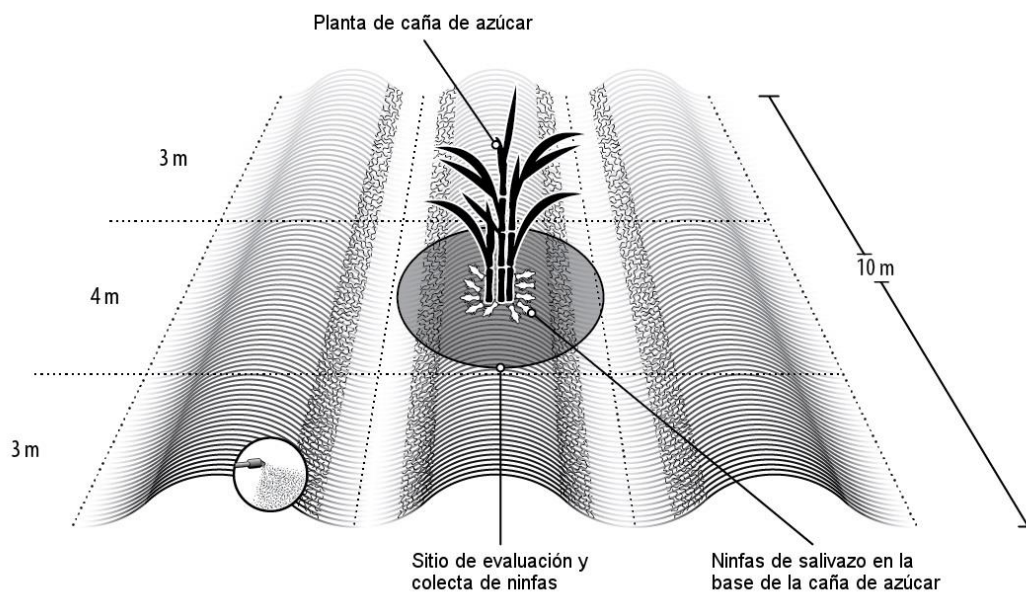


Figura 13. Parcela experimental de caña de azúcar y forma de aplicación de los NEP en surcos. La parte central indica el punto de evaluación y colecta de las ninfas de salivazo.

Las cepas de NEP (*Steinernema* sp. y *H. indica*) se aplicaron en concentraciones de  $66,000 \text{ JI m}^{-2}$  (2, 376,000 JI en  $36 \text{ m}^2$  por repetición realizada) de acuerdo al protocolo descritos por Leite *et al.* (2005). Para evitar contaminación entre tratamientos, los tres surcos aledaños se asperjaron con agua solamente y se consideraron áreas de separación entre parcelas experimentales. La parte central o parcela útil del surco de en medio (4.0 m) fue marcado y evaluado a través del tiempo. En cada uno de los puntos, antes de la aplicación, se realizó la contabilización de las ninfas presentes en la parte central de la parcela experimental. Se consideró la presencia de 10 o más ninfas de salivazo como parámetro para iniciar las aplicaciones y su posterior evaluación. Las ninfas fueron localizadas mediante banderas de 10 cm de largo en la parcela útil (centro).

### 5.3.1 Evaluación de los NEP sobre ninfas de salivazo

Para realizar la evaluación del efecto de los NEP, a los cinco días después de cada aplicación se colectaron aleatoriamente 10 ninfas en cada tratamiento con la ayuda de una cuchara de metal y pinzas entomológicas. En cada parcela se realizaron cuatro evaluaciones a través del tiempo; la primera para el quinto día, la segunda para el sexto día y así hasta completar cuatro. Se realizaron observaciones en las ninfas colectadas examinando si éstas presentaban cambios de coloración en su cutícula (rojo para el género *Heterorhabditis* y beige para *Steinernema*). Las ninfas colectadas fueron colocadas en contenedores individuales (cámaras húmedas), con trozos de plántulas de caña de azúcar. En el laboratorio, las ninfas se colocaron en cámaras húmedas, hechas con placas Sarstedt (AC & Co; Nümbrecht, Alemania) y con papel filtro estéril. Las ninfas se mantuvieron en observación en condiciones de laboratorio durante dos días posterior a cada día en que fueron colectadas. Transcurrido este tiempo las ninfas se disectaron bajo microscopio para verificar la causa de muerte; observándose la licuefacción del tejido y la presencia de NEP dentro del hospedero. Con ello se estimó diariamente el porcentaje de mortalidad de diez ninfas por cada tratamiento, en cuatro localidades y con cuatro evaluaciones a través del tiempo. Se calculó en forma acumulativa en cada unidad experimental. Se realizó un diseño completamente al azar con 3 tratamientos y 4 repeticiones por cada localidad (Figura 2). T1: *Steinernema* sp., + el dispersante Break-Thru® (Bayer) en 30 mL ha<sup>-1</sup>, T2: *H. indica* + dispersante, y T3: Testigo con aplicación de agua +

dispersante. Se realizó una comparación de medias entre tratamientos a través del modelo mixto:  $R_{ij} = \mu + \tau_i + S_j + \tau S_{ij} + E_{ij}$ , donde:  $S_j \sim N(0, \sigma^2_s)$ ,  $\tau S_{ij} \sim N(0, \sigma^2_{\tau s})$ ,  $\tau_i =$  Efecto del tratamiento  $i$ ,  $S_j =$  Efecto aleatorio del sitio  $j$ ,  $S_{ij} =$  Efecto del tratamiento del sitio  $j$  y el tratamiento  $i$ ,  $R =$  Porcentaje de ninfas muertas por nematodos. Posteriormente se realizó una prueba de medias, DMS de Fisher con corrección de Bonferroni mediante el paquete estadístico Infostat v. 2015 (Di Rienzo *et al.*, 2015).

#### 5.4 Ensayo 2: Valoración de *Steinernema* sp. cepa CP13ES sobre ninfas de salivazo

Debido a que ambas cepas fueron igualmente efectivas en el primer ensayo, se eligió *Steinernema* sp. cepa CP13ES para realizar un segundo ensayo en el año 2015, tomando en cuenta su mayor incidencia natural y su rápida reproducción. En condiciones de laboratorio (30 a 35°C), con esta cepa se obtienen los JI a los 6 días de la inoculación. Las aplicaciones se realizaron en las localidades California y Rincón del Oate (Cuadro 5). Estas parcelas no presentaron diferencias evidentes en topografía.

Cuadro 5. Localidades del estado de Veracruz, México donde se aplicaron los nematodos entomopatógenos nativos sobre ninfas de salivazo en caña de azúcar.

Ingenio	Localidad y municipios del estado de Veracruz, México	Localización geográfica	Variedad de caña de azúcar
Constancia	Estrella, Acatlán	18°33'34.6" N	CP 72-2086
		96°38'00.0" W	ITV 92-1424 Mex 69-290
Constancia	Rancho Tablas, Acatlán	18°33'53.8" N 96°39'00.0" W	Mex 69-290
Potrero	California, Ejido Ojo de Agua, Amatlán de los Reyes	18°51'22.9" N 96°59'53.1" W	ITV 290 CP 72-2086
Potrero	Rincón de Otates, Amatlán de los Reyes	18°55'62.4" N 96°52'28.9" W	Mex 79-431

Se aplicó la cepa *Steinernema* sp. + dispersante a una relación de 30 mL ha<sup>-1</sup>, además de un testigo (agua) + dispersante. La cepa fue aplicada a una concentración de 66,000 JI m<sup>-2</sup> (volumen total de 76 L de agua por lote, con un gasto de 19 L por parcela). Se realizaron cuatro aplicaciones por parcela. El ensayo se realizó en parcelas apareadas de 10 x 80 m cada una, dos en total. En cada parcela se seleccionaron de forma sistemática en zigzag, nueve puntos de muestreo de 1.0 m<sup>2</sup>, con una cepa de caña al centro. Se contaron todas las ninfas presentes en la base de la planta por cada punto de muestreo. Se evaluó de forma visual la cantidad de saliva producida por cada ninfa, para posteriormente registrar el nivel de saliva (alto, mediano y bajo) más recurrente en cada una de las nueve cepas.

Este experimento se analizó mediante un modelo de regresión Poisson, con el número de ninfas al inicio del experimento como una covariable, donde los productos cruzados ( $X1X2$ ,  $X1X3$  y  $X1X4$ ) representan la interacción. Asimismo, la significancia de los términos del modelo fue realizada a través de pruebas de Wald. El modelo  $y \sim \text{Poisson}(\lambda)$  fue el siguiente:  $\ln(y) = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_5 X_5 + \beta_6 X_1X_2 + \beta_7 X_1X_3 + \beta_8 X_1X_4$ . Donde  $X_1 = 1$ , si es del Tratamiento 1 (*Steinernema*); ó  $X_1 = 0$ , si es del Tratamiento 2 (testigo).  $X_2 = 1$ , si es del día 1; ó  $X_2 = 0$  si es de otra forma.  $X_3 = 1$ , si es del día 2; ó  $X_3 = 0$  si es de otra forma.  $X_4 = 1$ , si es del día 3, ó  $X_4 = 0$ , si es de otra forma.  $X_5 =$  Número de ninfas al inicio del experimento.  $y =$  Número de sobrevivencia de ninfas.

La cantidad de saliva evaluada se analizó a través de un modelo de medidas repetidas en el tiempo, con una matriz de correlación de simetría compuesta, por medio del paquete estadístico Infostat v. 2015 (Di Rienzo *et al.*, 2015). El modelo estadístico correspondiente fue:  $Y_{ij} = \mu + \tau_i + T_j + \tau T_{ij} + E_{ij}$ . Dónde:  $\mu =$  Media general.  $Y_{ij} =$  Cantidad de saliva en el tratamiento  $i$ , y el tiempo  $j$ .  $\tau_i =$  Efecto de Tratamiento  $i$ .  $T_j =$  Efecto de Tiempo  $j$ .  $T_{ij} =$  Efecto de interacción tiempo  $j$ , y tratamiento  $i$ .  $E_{ij} =$  Error experimental en el tiempo  $i$  en el tratamiento  $j$ .

## 5.7 Resultados

En el ensayo 1, los cambios en la coloración de la cutícula de las ninfas de salivazo sometidas a las aplicaciones de las cepas de *Steinernema* sp. y *H. indica*

permitieron contrastar la infección por el género de NEP aplicado. En las cuatro localidades, de las 10 ninfas tomadas al azar en cada colecta, algunas permanecieron protegidas por la saliva pero ya muertas, y presentaron cambios en la coloración de su cutícula por la infección de NEP. Otras estaban vivas, pero presentaban puntos de melanización en la región abdominal, patas y tórax, con disminución en sus movimientos, así como baja o nula producción de espuma protectora, muriendo al día siguiente de ser colectadas. La muerte por nematodos fue verificada al observar la licuefacción del tejido y la presencia de NEP dentro del hospedero. El análisis estadístico indicó que hay diferencia entre los tratamientos ( $P < 0.0001$ ), sin embargo la prueba de medias mostró que no hubo diferencias de mortalidad entre los tratamientos ( $P= 0.0150$ ), es decir, no hubo diferencia en la proporción de mortalidad causada por *H. indica* (73%) y *Steinernema* sp. (62%), pero sí la registrada en el testigo (14%) (Figura 13). No se encontraron efectos atribuibles a la interacción sitio x tratamiento ( $P= 0.88$ ), ni efectos atribuibles al sitio ( $P= 0.999$ ).

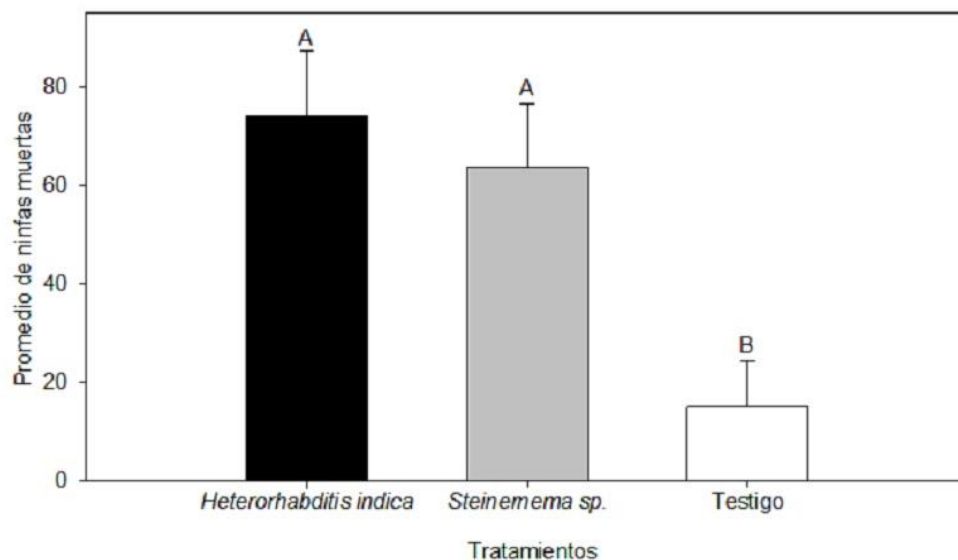


Figura 14. Prueba de medias para la infectividad en campo de *Steinernema* sp. y *Heterorhabditis indica*. Barras con misma letra indican que no existen diferencias entre sí.

En el ensayo 2, el tratamiento *Steinernema* sp. + dispersante presentaron una interacción ( $p = 0.0001$ ) con el tiempo de evaluación (Figura 14). El comportamiento de la mortalidad de las ninfas tratadas con *Steinernema* sp. + dispersante fue totalmente distinto al testigo (agua + dispersante) (Cuadro 6). Con el tratamiento la tendencia a través del tiempo fue disminuir las poblaciones, mientras que en el testigo las poblaciones de ninfas aumentaron. Sin embargo, la variable producción de saliva no mostró interacción significativa del tiempo con el tratamiento ( $p = 0.462$ ) ni del tiempo como factor principal ( $p = 0.266$ ); tampoco mostró una clara diferencia entre tratamientos ( $p = 0.070$ ).

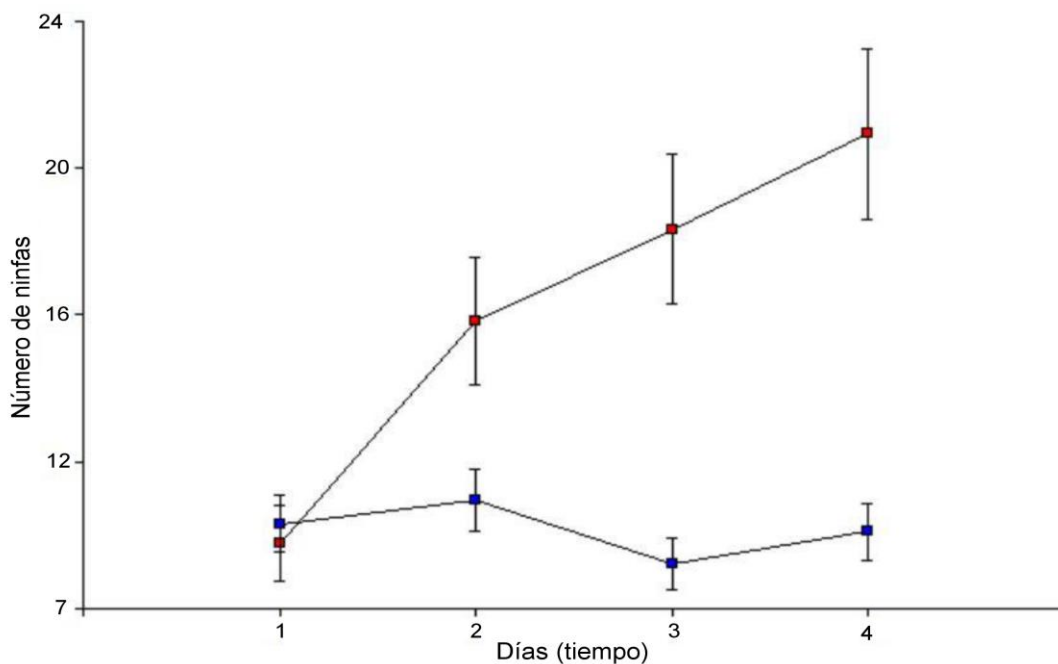


Figura 15. La interacción entre tratamientos en el tiempo de evaluación indica que el nematodo *Steinernema* sp., mantiene bajas las poblaciones de ninfas de salivazo y se incrementan en el testigo.

Cuadro 6. Prueba de hipótesis que presenta las diferencias en sobrevivencia de ninfas de salivazo en caña de azúcar tratadas con *Steinernema* sp. + dispersante, y el testigo + dispersante, evaluados a través del tiempo.

Fuentes de variación		Grados de libertad	-2[L0-L1]	Valor de Probabilidad (p)
Tratamiento	( $\beta 1$ )	1	55.34	< 0.0001
Día de evaluación	( $\beta 2, \beta 3, \beta 4$ )	3	24.32	< 0.0001
Población inicial	( $\beta 5$ )	1	75.67	< 0.0001
Tratamiento*Día de evaluación	( $\beta 6, \beta 7, \beta 8$ )	3	21.23	0.0001

Aparentemente, las especies de mosca pinta representadas como un complejo para algunas localidades, no influyeron de forma relevante en el control efectuado por los NEP en ambos ensayos. Para el ingenio Constanca, la especie predominante fue *Aeneolamia albofasciata*, incluso fue la única especie presente en el sitio 1. En el ingenio Potrero *A. albofasciata* y *A. contigua* fueron abundantes el sitio 3 y competitivas en la cuarta localidad, asociada al ingenio El Potrero; mientras que la especie *Prosapia simulans* estuvo presente en bajas proporciones en las dos localidades del mismo ingenio. *P. teapana* se presentó en tres de las cuatro localidades, pero siempre en bajas proporciones (Cuadro 7).



Cuadro 7. Presencia de especies de salivazo o mosca pinta en las localidades donde se aplicaron los nematodos entomopatógenos nativos en Veracruz, México.

Ingenio	Localidad	Variedad de la caña	Especie de la mosca pinta	% de presencia
Constancia	Estrella	CP 72-2086	<i>Aeneolamia</i>	100%
		ITV 92-1424 Mex 69-290	<i>albofasciata = postica</i>	
Constancia	Rancho Tablas	Mex 69-290	<i>Aeneolamia</i>	98%
			<i>albofasciata = postica</i> <i>Prosapia teapana</i>	2%
Potrero	California	ITV 290	<i>Aeneolamia</i>	91%
		CP 72-2086	<i>albofasciata = postica</i>	
			<i>Prosapia simulans</i> <i>Prosapia teapana</i>	
Potrero	Rincón del Otate	Mex 79-431	<i>Aeneolamia</i>	43%
			<i>albofasciata = postica</i>	38%
			<i>Aeneolamia contigua</i>	12%
			<i>Prosapia simulans</i> <i>Prosapia teapana</i>	7%

Las cuatro localidades en donde fueron realizados los experimentos están representadas predominantemente por texturas arcillosas. Las localidades pertenecientes al ingenio El Potrero presentan medianamente alta acidez, indicando la posible ausencia de fósforo o magnesio. Sin embargo, en las dos localidades del ingenio Constancia los suelos se consideran neutros. La cantidad de materia orgánica fue escasa en la primera localidad, no así en las tres restantes (Cuadro 8). Aparentemente, no hubo efecto de la variabilidad en los suelos de las cuatro localidades en que se realizaron los ensayos, en la

efectividad de los NEP, pues al parecer no afectó la capacidad de búsqueda e invasión, y la mortalidad causada a las ninfas de salivazo.

Cuadro 8. Características del suelo en las localidades del estado de Veracruz, México, donde se evaluó *Steinernema* sp. y *H. indica* contra ninfas de salivazo en caña de azúcar.

Localidad	pH	Conductividad eléctrica (ds m <sup>-1</sup> )	Materia orgánica (%)	Densidad real (g cm <sup>-3</sup> )	Arcilla (%)	Limo (%)	Arena (%)	Textura
Estrella	7.50	0.30	7.88	2.284	34.9	25.82	39.28	Franco-arcillosa
Rancho Tablas	7.19	0.35	3.55	2.113	44.9	22.22	32.88	Arcillosa
California	5.63	0.37	9.85	2.089	48.9	17.82	33.28	Arcillosa
Rincón del Otate	4.27	0.24	3.56	2.230	54.9	29.82	15.28	Arcillosa

## 5.8 Discusión

Los NEP nativos presentaron la cualidad de atravesar la capa espumosa que protege a las ninfas de salivazo y causarles una mortalidad moderada, lo cual concuerda con investigaciones realizadas por [Ferrer et al. \(2004\)](#) y [Leite et al. \(2005\)](#). La infectividad fue similar a la encontrada por [Batista y Machado \(2010\)](#) con la aplicación de *Steinernema riobrave* (71%) y *Heterorhabditis amazonensis* (57%) hacia ninfas de *Mahanarva spectabilis* en pastos, a una concentración de 2000

NEP ml<sup>-1</sup>. Sin embargo, contra *A. varia*, [Moreno-Salguero et al. \(2012\)](#) encontraron mayor efectividad de *Heterorhabditis* sp. (76%) que con *Steinernema* sp. (42%).

De acuerdo a [Ferrer et al. \(2004\)](#), *H. bacteriophora* es capaz de causar de 71 a 75% de mortalidad en ninfas de *A. varia* a dosis de 5x10<sup>7</sup>JI ha<sup>-1</sup>. [Leite et al. \(2005\)](#) utilizaron *Heterorhabditis* sp. a dosis de 6.6X10<sup>7</sup> JI ha<sup>-1</sup> para el control de *M. fimbriolata* en caña de azúcar, con mortalidad en ninfas de 43 a 74%. En nuestro segundo ensayo, *Steinernema* sp. logró mantener la sobrevivencia de la plaga a niveles bajos, mientras que en el testigo la población incrementó al final del periodo de evaluación.

Nuestros resultados indican que ambas cepas de NEP podrían aportar al manejo integrado de plagas de este cultivo en la región de estudio. Las cepas *H. indica* CP13JA y *Steinernema* sp. CP13CE fueron similares respecto a su efectividad en campo, con porcentajes de mortalidad medios. *H. indica* se ha considerado promisorio para disminuir varias plagas en campo. Una cepa nativa de *H. indica* también causó mortalidades medias a larvas de lepidópteros en invernadero sobre plantas de algodón a dosis de 1000 JI ml<sup>-1</sup> ([Divya et al., 2010](#)). Inclusive, la combinación de *H. indica* con el parasitoide *Habrobracon hebetor* potencializó la mortalidad del lepidóptero *Plodia interpunctella* en 98 a 99% ([Mbata y Shaphio-Ilan 2010](#)). Los resultados anteriores señalan la importancia que ha tenido *H. indica* y el uso de cepas nativas como controladores de plagas pertenecientes al mismo cultivo en el que fueron halladas. *Steinernema* sp. CP13JA, fue evaluado un

segundo año respecto a su efectividad sobre ninfas de salivazo. [Thurston et al., \(1994\)](#) indican que las preadaptaciones de los organismos nativos a las condiciones edafoclimáticas, tales como niveles irregulares de salinidad en su hábitat, no disminuyen su patogenicidad, esto les permite sobrevivir en diversos tipos de suelos agrícolas ([Nielsen et al., 2011](#)). La patogenicidad de las cepas utilizadas en esta investigación coinciden con lo dicho por estos autores. Por lo que para lograr introducir los NEP *Steinernema* sp. o *H. indica* a condiciones de campo, se deberán estudiar más a detalle, tanto su reproducción, como algunos procedimientos más eficiente para su establecimiento en el cultivo ([Bustillo et al., 2011](#)). Además, deberá evaluarse el beneficio / costo de la aplicación, ya que la dosis de JI podría ser menor a la utilizada en esta investigación, con lo que se podrían obtener porcentajes de mortalidad de ninfas similares o superiores a menores costos.

Esta investigación considera importante el uso de cepas nativas como medida de control de los insectos plaga presentes en el sitio o la región de origen de las cepas. Las condiciones de temperatura promedio en la región de estudio, al parecer no afectaron la patogenicidad de los NEP utilizados durante la evaluación. Esto concuerda con las observaciones de [Shapiro-Ilan et al. \(2006\)](#), quienes indican que las cepas nativas están adaptadas a las temperaturas y demás condiciones ambientales en las que se han desarrollado. De acuerdo a [Kaya \(1990\)](#) y [Grewal et al. \(1994\)](#), las cepas nativas son proclives a ser más eficientes

para el control de sus huéspedes en su sitio de origen, que los organismos introducidos.

En los últimos años, las aplicaciones de entomopatógenos al cultivo de caña de azúcar se han enfocado al uso del hongo *Metarhizium anisopliae*, el cual ha permitido reducir significativamente las poblaciones de adultos de salivazo (Allard *et al.*, 1990; Alatorre-Rosas y Hernández-Rosas, 2015), con mortalidades que varían desde 16 hasta 80% seis días después de su aplicación (Tiago *et al.*, 2011). Además, este entomopatógeno ha reducido las poblaciones de otras plagas de insectos presentes en la caña de azúcar (Samson *et al.*, 2006; Williams *et al.*, 2013). Las aplicaciones de hongos entomopatógenos han sido dirigidas hacia el adulto. El uso de NEP se dirige al control de los estados ninfales, por lo que las combinaciones en el uso de hongos entomopatógenos y NEP permitirían un mayor control de la plaga, lo que podría conformar un paquete tecnológico más efectivo en el control biológico del salivazo.

## 5.9 Literatura Citada

Alatorre-Rosas, R., y F. Hernández-Rosas. 2015. Mosca pinta, *Aeneolamia* spp. y *Prosapia* spp. (Hemiptera: Cercopidae). pp. 141-164. *In* Arredondo-Bernal,

- H., and L. A. Rodríguez del Bosque. 2015. Casos de Control Biológico en México. México, Ed. Colegio de Postgraduados.
- Allard, G. B., C. A. Chase, J. B. Heale, J. E. Isaac, and C. Prior. 1990. Field evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) as a mycoinsecticide for control of sugarcane froghopper, *Aeneolamia varia saccharina* (Hemiptera: Cercopidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 55: 41-46.
- Batista, P. E., and A. A. Machado. 2010. Application methods of entomopathogenic nematodes for control of *Mahanarva spectabilis* (Hemiptera: Cercopidae). *Biocontrol Science and Technology*, 20: 1079-1085.
- Batista, P. E., A. A. Machado, V. Andalo, and C. M. de Oliveira Monteiro. 2014. Virulence of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae) to spittlebug *Mahanarva spectabilis* (Hemiptera: Cercopidae). *Plant Parasitology*, 81: 145-149.
- Bustillo P., A. E., M. Rosero G., C. A. Moreno S., J. C. López N., U. Castro V., and G. A. Vargas O. 2011. Control biológico del salivazo *Aeneolamia varia* (F.) (Hemiptera: Cercopidae). Evaluación de nematodos entomopatógenos. *Cenicaña (Serie Divulgativa)*, 15: 1-12.
- Cabanillas, H. E., and J. R. Raulston. 1994. Evaluation of the spatial pattern of *Steinernema riobravis* in corn plots. *Journal of Nematology*, 26: 5-31.
- Calderón, M., G. Arango, V. A. Fernán, y G. C. Valencia. 1982. Cercópidos Plaga de los Pastos en América Tropical. *Biología y Control. Serie 04SP-03.02* Cali, Colombia. CIAT.

- Clark, W. E., G. E. Ibarra, and H. W. Van. 1976. Taxonomy and biology of spittlebugs of the genera *Aeneolamia* Fennah and *Prosapia* Fennah (Cercopidae) in northeastern Mexico. *Folia Entomológica Mexicana* 34: 13-24.
- Di Rienzo, J. A., F. Casanoves, M. G. Balzarini, L. Gonzalez, M. Tablada, and C. W. Robledo. 2015. InfoStat Versión 2015. Universidad Nacional de Córdoba. Grupo Córdoba, Argentina. InfoStat, FCA. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Divya, K., M. Sankar, and K. N. Marulasiddesha. 2010. Efficacy of entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis indica* against three lepidopteran insect pests. *Asian Journal of Experimental Biological Sciences*, 1: 183-188.
- Ferrer, F., M. Arias, A. Trelles, G. Palencia, J. M. Navarro, y R. Colmenarez. 2004. Posibilidades del uso de nematodos entomopatógenos para el control de *Aeneolamia varia* en caña de azúcar. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, 72: 39-43.
- García-García, C. G., J. López-Collado, M. E. Nava-Tablada, J. A. Villanueva-Jiménez, and J. Vera-Graziano. 2006. Modelo de predicción de riesgo de daño de la mosca pinta *Aeneolamia postica* (Walker) Fennah (Hemiptera: Cercopidae). *Neotropical Entomology*, 35: 677-688.
- Gómez, L. A. 2007. Manejo del salivazo *Aeneolamia varia* en cultivos de caña de azúcar en el Valle del Río Cauca. *Cenicaña (Carta Trimestral)*, 29: 10-17.

- Grewal, P. S., S. Selvan, and R. Gaugler. 1994. Thermal adaptation of entomopathogenic nematodes-niche breadth for infection, establishment and reproduction. *Journal of Thermal Biology*, 19: 245-253.
- Kaya, H. K. 1990. Effects of soil temperature, moisture, and relative humidity on entomopathogenic nematode persistence. *Journal of Invertebrate Pathology*, 57: 242-249.
- Leite, L. G., A. L. Machado, M. R. Goulart, M. F. Tavares, and F. A. Batista. 2005. Screening of entomopathogenic nematodes (Nemata: Rhabditida) and the efficiency of *Heterorhabditis* sp. against the sugarcane root spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Fabr.) (Hemiptera: Cercopidae). *Neotropical Entomology*, 34: 785-790.
- Mankowski, M. E., H. K. Kaya, G. J. Kenneth, and B. Sipes. 2005. Differential susceptibility of subterranean termite castes to entomopathogenic nematodes. *Biocontrol Science and Technology* 15: 367-377.
- Mbata, G. N., and D. I. Shapiro-Ilan. 2010. Compatibility of *Heterorhabditis indica* (Rhabditida: Heterorhabditidae) and *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) for biological control of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Biological Control*, 54: 75–82.
- Moreno-Salguero, C. A., A. E. Bustillo-Pardey, J. C. López-Núñez, U. Castro-Valderrama, y G. D. Ramírez-Sánchez. 2012. Virulencia de nematodos entomopatógenos para el control del salivazo *Aeneolamia varia* (Hemiptera: Cercopidae) en caña de azúcar. *Revista Colombiana de Entomología*, 38: 260-265.



- Nielsen, A. L., K. O. Spence, J. Nakatani, and E. E. Lewis. 2011. Effect of soil salinity on entomopathogenic nematode survival and behavior. *Nematology*, 13: 859-867.
- Peck, D., U. Castro, F. López, A. Morales, and J. Rodríguez. 2001. First records of the sugar cane and forage grass pest, *Prosapia simulans* (Homoptera: Cercopidae), from South America. *Florida Entomologist*, 84: 402-409.
- Pillay, U., L. A. Martin, R. S. Rutherford, and S. D. Berry. 2009. Entomopathogenic nematodes in sugarcane in South Africa. *Proceedings of the South African Sugar Technologists Association*, 82: 538-541.
- Samson, P. R., T. N. Staier, and J. I. Bull. 2006. Evaluation of an application procedure for *Metarhizium anisopliae* in sugarcane ratoons for control of the white grub *Dermolepida albohirtum*. *Crop Protection*, 25: 741-747.
- Sánchez-Saavedra, M. G., H. Cortez-Madrugal, y D. Cristobal-Acevedo. 2012. Infectividad de *Heterorhabditis indica* (Rhabditida: Heterorhabditidae) en adultos y larvas de gallina ciega (Coleoptera: Melolonthidae). *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 18: 383-394.
- Shapiro-Ilan, D. I., D. H. Gouge, S. J. Piggott, and J. P. Fife. 2006. Application technology and environmental considerations for use of entomopathogenic nematodes in biological control. *Biological Control*, 38: 124-133.
- Thompson, V. 2004. Associative nitrogen fixation, C4 photosynthesis, and the evolution of spittlebugs (Hemiptera: Cercopidae) as major pests of neotropical sugarcane and forage grasses. *Bulletin of Entomological Research*, 94: 189-200.

- Thurston, G. S., N. Yansong, and H. K. Kaya. 1994. Influence of salinity on survival and infectivity of entomopathogenic nematodes. *Journal of Nematology*, 26: 345-351.
- Tiago, P.V., H. M. Lima-Souza, J. B. Moyses, N. T. Oliveira, and E. A. Alvares-Lima. 2011. Differential pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* and the control of the sugarcane root spittlebug *Mahanarva fimbriolata*. *Brazilian Archives Biology Technology*, 54: 435-440.
- Williams, T., H. C. Arredondo-Bernal, and L. A. Rodríguez-del-Bosque. 2013. Biological pest control in Mexico. *Annual Review of Entomology*, 58: 119-140.
- Yadav, A. K., and Lalramliana. 2012. Soil moisture effects on the activity of three entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) isolated from Meghalaya, India. *Journal of Parasitic Diseases*, 36: 94-98.

## CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN GENERAL

La preadaptación de los nematodos les ha brindado una alta especialización al medio, a su hospedero y a la fabricación de herramientas necesarias para poder establecerse y sobrevivir en el ambiente. Los nematodos entomopatógenos han sufrido múltiples variaciones anatómicas, fisiológicas, químicas y de especiación, que les han ayudado a sobrevivir en presencia de factores bióticos y abióticos presentes en el medio en que se desarrollan. Por ello se considera de suma importancia buscar nuevas cepas o especies que estén adaptadas al medio, para poderlas evaluar contra distintos hospederos en el hábitat en el que estos fueron encontrados.

En esta investigación se mencionan trabajos realizados con cepas de nematodos entomopatógenos presentes en el cultivo de la caña de azúcar. Se determinó el parentesco de *H. indica* (CP13JA), con la especie *H. indica* descrita por Poinar Jr. *et al* (1992). Los estudios moleculares, morfológicos y morfométricos realizados corroboraron esa identidad. La presencia de esta especie en el cultivo de caña de azúcar, sugiere su adaptabilidad edafoclimática a zonas con clima cálido húmedo; lo que favorece una adaptación a altas temperaturas y humedades. La cepa *H. indica* CP13JA es considerada una cepa nueva para México presente en el cultivo de caña de azúcar y adaptada a la zona central de Veracruz.

La segunda cepa, *Steinernema* sp. CP13ES muestra congruencia para poderse considerar como una nueva especie, integrante del grupo IV. Se demostró una particularidad en su biología, que corresponde a la rápida emergencia de los J1 a los 6 días a 30°C, carácter único para el grupo IV, al cual pertenece. Datos morfológicos y morfométricos así como el análisis filogenético basado en las secuencias ITS1 + 5.8S + ITS2, 28S de DNAr y 12S, ayudan a complementar la sugerencia de que se trate de una especie nueva (*Steinernema mictlani* n. sp.), la cual se encuentra filogenéticamente cercana a *S. riobrave*.

El suelo, ambiente complejo y difícil de habitar, es considerado el hábitat natural de los NEP, el cual puede variar en composición química y estructura física, además de considerarse un sistema dinámico en constante estado de flujo. La coevolución con respecto a su hospedero y el nicho adaptativo, se liga a su capacidad para adaptarse a diversos medios, sobrevivir y parasitar a su hospedero. Los resultados obtenidos en los experimentos en campo muestran su efectividad contra ninfas de mosca pinta. Los NEP *Steinernema* sp. cepa CP13CE y *H. indica* cepa CP13JA tienen la capacidad para buscar e infectar a su hospedero, atravesar la capa espumosa en condiciones de campo y disminuir significativamente la población de ninfas de mosca pinta. Se puede concluir que estas cepas de NEP están adaptadas al ambiente cálido-húmedo de la zona centro de Veracruz, que pueden sobrevivir en diferentes tipos de suelo arcillosos, arenosos y limosos, y tienen la capacidad de infectar a las especies prevalentes de mosca pinta en la zona. Por lo que estos nematodos pueden considerarse como una alternativa viable y efectiva para el control de ninfas de la mosca pinta en el cultivo de la caña de azúcar para la zona de Veracruz.