



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

**“NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS PROCEDENTES DE LA
RIZOSFERA DE SUELOS MAICEROS INFESTADOS CON LA
GALLINA CIEGA *Phyllophaga polyphylla* Bates”**

ROMÁN NEGRETE GARCÍA

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

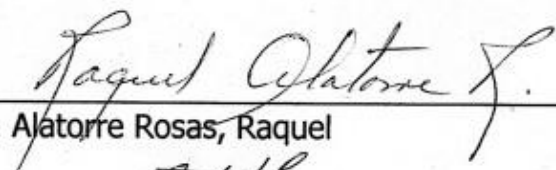
2013

La presente tesis titulada: NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS PROCEDENTES DE LA RIZOSFERA DE SUELOS MAICEROS INFESTADOS CON LA GALLINA CIEGA *Phyllophaga polyphylla* Bates, realizada por el alumno: Negrete García Román, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

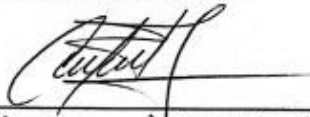
MAESTRO EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

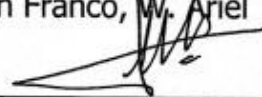
CONSEJERO


Dra. Alatorre Rosas, Raquel

ASESOR


Dr. Guzmán Franco, W. Ariel

ASESOR


M. C. Valdez Carrasco, J. Manuel

ASESOR


M. C. Tamayo Mejía, Fernando

Montecillo, Texcoco, Estado de México, 2013

**“NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS PROCEDENTES DE LA RIZOSFERA
DE SUELOS MAICEROS INFESTADOS CON LA GALLINA CIEGA**

***Phyllophaga polyphylla* Bates”**

Ing. Negrete García, Román
COLEGIO DE POSTGRADUADOS 2013

RESUMEN

Las gallinas ciegas se encuentran entre las plagas de suelo de mayor importancia económica en el mundo, incluyendo México. Considerando que el suelo es el ambiente más favorable para los nematodos entomopatógenos (NEP), es posible recuperar aislamientos de NEP que puedan tener el potencial para ser desarrollados como agentes de control biológico de esta plaga. Por esta razón se llevó a cabo un muestreo en el estado de Guanajuato, una de las regiones agrícolas más importantes de México. La colecta de nematodos se realizó utilizando larvas de *Galleria mellonella* como cebo en lugares con grandes poblaciones de gallina ciega. Los nematodos obtenidos se identificaron utilizando métodos morfológicos y moleculares. Después, la susceptibilidad de la gallina ciega *Phyllophaga polyphylla* Bates fue evaluada contra los aislamientos de nematodos recolectados. Se obtuvieron dos aislamientos, ambos del género *Steinernema* (I-23, III-16) y de acuerdo a los análisis morfológicos y moleculares, ninguno de ellos se ajusta con las descripciones de especies disponibles. Las larvas de *P. polyphylla* no fueron susceptibles a estos nematodos (infección nunca por encima del 15%), pero una infección mayor (50%) se obtuvo cuando un aislamiento exótico de *Heterorhabditis bacteriophora* fue evaluado. Las implicaciones de los resultados en el control de la gallina ciega y posibles explicaciones a la falta de infección por los aislamientos de *Steinernema* spp. son discutidos.

Palabras clave: Gallina ciega, *Steinernema*, muestreo, susceptibilidad

ABSTRACT

White grubs are amongst the most economically important soil pests throughout the world, including Mexico. Considering that the soil is the most favourable ambient for entomopathogenic nematodes (EPN), it is likely that some EPN isolates can be recovered that may have the potential to be developed as biological control agents of this pest. A survey was carried out in Guanajuato, one of the most agricultural regions of Mexico. Nematode collection was carried using *G. mellonella* larvae as bait in soil from locations with large white grub populations. Nematodes were identified using morphological and molecular methods. Then, the susceptibility of the white grub *Phyllophaga polyphylla* larvae was tested against isolates collected. Two isolates were recovered, both of the genus *Steinernema* (I-23, III-16) and according to the morphological and molecular analyses; none of them fit any description. *P. polyphylla* larvae were not susceptible to these nematodes (infection never above 15%), but a greater infection (50%) was achieved when an exotic *H. bacteriophora* isolate was tested. The implications of the results in the control of white grubs, and potential explanations of a lack of infection by the *Steinernema* spp. isolates are discussed.

Keywords: white grub, *Steinernema*, survey, susceptibility

DEDICATORIA

A Dios, porque gracias a él tengo la vida, la razón y el entusiasmo de salir adelante. Todo lo que hago es ofrecido a su infinita misericordia. Bendice mi vida, mi trabajo, mi cruz y la de todos los que me rodean!!!

A la santísima Virgen de Guadalupe, por su protección y amorosa intercesión ante el todo poderoso. Acompañame siempre!!!

A tí, por todos los bellos momentos que hemos compartido juntos, por todo el amor que nos tenemos y por tu apoyo moral brindado en los momentos más difíciles de mi vida. Pero también, por darme el más preciado tesoro que Dios le permitió, mi hijo Román Yareth; gracias Rosy “te amo”.

Para tí mi chiquitín, te dedico esta tesis con todo mi amor y cariño que tengo desde que estabas en el vientre de tu mamá y por ser mi orgullo y motivación más grande que tengo en la vida para hacer las cosas de la mejor manera y agradezco a Dios por mandarme un angelito maravilloso y espero que algún día te sientas orgulloso de mí y de tu mamá “te amo hijo”.

A mis padres, por darme la vida y quienes me han enseñado que el valor del tiempo, se otorga en segundos, minutos y horas compartidas en alegrías, retos, logros y cariño pero sobre todo por su incondicional amor. Con su educación me inculcaron a ser hombre de bien, a salir adelante con base en el trabajo y esfuerzo. Son mi base y mi modelo a seguir y este logro es para ustedes, espero se sientan orgullosos. Gracias Papá y Mamá “los amo”.

Más allá de los lazos de sangre, nos une el deseo de superación; Elizabeth y Jorge, hermanos, gracias por ser el motivo para lograr esta meta, han sido mi incentivo para llegar a ella y de todo corazón se las dedico así como todo mi amor y cariño. Los quiero y los admiro profundamente.

A mis suegros y familia, por todo el amor y cariño que me han demostrado y también por permitirme ser parte de su linda familia; que Dios los bendiga.

A mis abuelitos, Amelia Martínez y Leopoldo Negrete, mis tíos Vladimir García Martínez y Santiago Mier Rodríguez así como a toda mi familia, por todo el amor, cariño y consejos brindados a lo largo de mi vida, por eso, este logro se las dedico con todo mi amor y cariño, para demostrarles que no fue infructuoso el esfuerzo tan grande que hicieron mis padres para terminar la tesis y obtener el grado de Maestro en Ciencias. Dios los bendiga.

A los Ángeles que me acompañan por siempre, mis Abuelitos Ma. Loreto^t, Luisito^t, Pa Lalito^t y Ma Lupita^t; sean mis guardianes, mis ángeles de la guardia.

A la familia Ambríz Gallardo, por compartir gratos momentos, por su apoyo moral y por considerarme como parte de su familia. Dios los bendiga.

A la Dra. Martha Elena Pedraza Santos, por brindarme su apoyo incondicional en todo momento.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Raquel Alatorre Rosas, con admiración y respeto, por brindarme su apoyo, paciencia y dedicación en la asesoría del presente trabajo. Gracias por haberme transmitido sus conocimientos, por brindarme su amistad, por sus palabras de aliento y confianza. Dios la bendiga.

Al Dr. Ariel Guzmán Franco, por sus sugerencias realizadas, por su paciencia y por el apoyo incondicional que me brindó para la realización del presente trabajo.

Al M. C. Jorge Manuel Valdéz Carrasco, por su amistad y ayuda en la realización, procesamiento y toma de las fotografías así como por sus sugerencias realizadas en el presente trabajo al formar parte de mi consejo particular.

Al M. C. Fernando Tamayo Mejía, por formar parte de mi consejo particular así como por gestionar los apoyos económicos para la realización del presente trabajo.

A la bióloga Greta Hanako Rosas Saïto del Laboratorio de Microscopía Electrónica del Colegio de Postgraduados, por su valioso apoyo y tiempo en la obtención de imágenes de barrido en los especímenes, además de brindarme su amistad.

Al Colegio de Postgraduados, al que debo mi formación profesional.

A Fundación Produce Guanajuato A. C., proyecto FGP521/09-SIFP-11-2007-0271, por su financiamiento otorgado para la presente investigación.

Al CONACYT, por la beca otorgada, la cual me ayudó a concluir mis estudios de Postgrado.

*Al Ing. Alejandro Martínez Hernández, por su apoyo proporcionado para la obtención de las larvas de *Galleria mellonella* utilizadas en esta investigación.*

A todos los profesores del programa Entomología y Acarología que de una manera u otra contribuyeron en mi formación académica, aportándome los conocimientos necesarios.

A todo el personal manual y administrativo del Colegio de Postgraduados. Gracias por sus atenciones.

A todos los compañeros del laboratorio de Patología de Insectos y conocidos durante mi estancia en el Colegio de Postgraduados, de manera especial a Ausencio Azuara Domínguez, Procoro Gómez Martínez, Carlos Lázaro Castellanos, Salvador Hernández Moreno y Yurixhí Atenea Raya Montaña, con quienes pasé gratos momentos y por brindarme su amistad en todo momento.

Al Dr. Ignacio Cid del Padro Vera, por sus valiosos comentarios en el presente trabajo y facilitarme el laboratorio de Nematología del Colegio de Postgraduados.

Al Dr. Daniel Téliz Ortiz, por su amistad y gran apoyo incondicional.

A los productores de la comunidad de San Lorenzo, municipio de Jerécuaro, Guanajuato, por su hospitalidad y su ayuda en la obtención de material biológico.

A la Sra. Irene y Concha, por su amistad y por abrirme las puertas de su hogar durante mi estancia en Texcoco, edo. de México.

CONTENIDO	PÁGINA
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS	xiv
GLOSARIO	xviii
ABREVIATURAS	xix
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVO GENERAL	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES	5
1.1. ESPECIES DE GALLINAS CIEGAS Y DAÑOS EN LOS CULTIVOS	5
1.2. MÉTODOS DE CONTROL EMPLEADOS EN GALLINA CIEGA	6
1.2.1. CONTROL CULTURAL	6

1.2.2. CONTROL QUÍMICO	7
1.2.3. CONTROL BIOLÓGICO	8
1.2.3.1. LOS PARASITOIDES EN EL CONTROL DE LA GALLINA CIEGA	8
1.2.3.2. LAS BACTERIAS ENTOMOPATÓGENAS EN EL CONTROL DE LA GALLINA CIEGA	10
1.2.3.3. LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS EN EL CONTROL DE LA GALLINA CIEGA	11
1.2.3.4. LOS NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS EN EL CONTROL DE LA GALLINA CIEGA	13
1.3. LITERATURA CITADA	17
CAPÍTULO 2. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MORFOMÉTRICA DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS (NEMATODA: STEINERNEMATIDAE) COLECTADOS EN GUANAJUATO, MÉXICO	28
2.1. MATERIALES Y MÉTODOS	29
2.2. SELECCIÓN DE ÁREAS DE COLECTA	29
2.3. COLECTA DE MUESTRAS DE SUELO	29
2.4. PROCEDIMIENTO PARA EL AISLAMIENTO DE NEP (NEMATODOS	30

ENTOMOPATÓGENOS)

2.5. PROPAGACIÓN, CONSERVACIÓN Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE NEMATODOS	31
2.6. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA	32
2.6.1. PREPARACIÓN DE ESPECÍMENES PARA MICROSCOPIA DE LUZ	32
2.6.2. PREPARACIÓN DE ESPECÍMENES PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	33
2.6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
2.6.3.1. DESCRIPCIÓN DEL AISLADO I-23	35
2.6.3.1.1. MACHOS PRIMERA GENERACIÓN	35
2.6.3.1.2. MACHOS SEGUNDA GENERACIÓN	36
2.6.3.1.3. HEMBRAS PRIMERA GENERACIÓN	39
2.6.3.1.4. HEMBRAS SEGUNDA GENERACIÓN	40
2.6.3.1.5. JUVENIL INFECTIVO	40
2.6.3.2. DESCRIPCIÓN DEL AISLADO III-16	43
2.6.3.2.1. MACHOS PRIMERA GENERACIÓN	43
2.6.3.2.2. MACHOS SEGUNDA GENERACIÓN	43

2.6.3.2.3. HEMBRAS PRIMERA GENERACIÓN	43
2.6.3.2.4. HEMBRAS SEGUNDA GENERACIÓN	44
2.6.3.2.5. JUVENIL INFECTIVO	44
2.7. LOCALIDAD TIPO	50
2.8. HOSPEDERO TIPO	50
2.9. BIOLOGÍA	50
2.10. ESPECÍMENES TIPO	51
2.11. DIAGNOSIS Y RELACIÓN CON OTROS AISLADOS	51
2.12. LITERATURA CITADA	57
CAPÍTULO 3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR	61
3.1. MATERIALES Y MÉTODOS	62
3.1.1. DETERMINACIÓN MOLECULAR	62
3.1.1.1. EXTRACCION DE ADN	62
3.1.1.2. PCR Y SECUENCIACIÓN	62
3.1.1.3. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS	63

3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	64
3.3. LITERATURA CITADA	67
CAPÍTULO 4. EVALUACIÓN DE LA PATOGENICIDAD DE LOS NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS <i>Steinernema</i> sp. (I-23 Y III-16) y <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> (Hb3) SOBRE <i>Phyllophaga polyphylla</i> BATES	71
4.1 MATERIALES Y MÉTODOS	71
4.1.1. NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS	71
4.1.2. INSECTOS	72
4.1.3. CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE LOS AISLAMIENTOS DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS	73
4.1.4. PATOGENICIDAD	73
4.2. RESULTADOS	74
4.3. DISCUSIÓN	76
4.4. LITERATURA CITADA	78
5.0. DISCUSIÓN GENERAL	82
6.0. CONCLUSIONES	83

ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

- Figura 1. Microscopía electrónica de barrido primera generación *Steinernema* 38
sp. (I-23). A-B, cola de machos mostrando la distribución de papilas
genitales, papila ventral (pv) así como mucrón (m) y campos laterales
(c). C, región cefálica mostrando el estoma del macho y la hembra; 6
papilas labiales, 4 cefálicas y 2 anfidios (a). D, región anterior de la
hembra mostrando el poro excretor (p). E, región posterior de la
hembra mostrando el mucrón (m), fasmidio (f), hinchamiento
postanal (hp) y ano (an). F, vulva ubicada en la porción media ventral
del cuerpo.
- Figura 2. Microscopía de luz primera generación *Steinernema* sp. montados en 39
lactofenol azul de algodón. A-B región cefálica de machos. C, región
posterior con proyección de mucrón. D, región anterior de la hembra.
E, vulva conoide. F, hinchamiento post-anal y mucrón. G, hembra
primera generación. H, macho con posición en forma de J. I-J, juvenil
infectivo, región cefálica proyectándose el bulbo esofágico y el poro
excretor.
- Figura 3. Microscopía electrónica de barrido y luz, espículas y gubernáculum 40
de primera generación de machos. A-B, espículas terminadas en
punta roma y con presencia de velum. C-D, gubernáculum con
presencia de cuneus.

- Figura 4. Microscopía electrónica de barrido juvenil infectivo. A-B, región anterior mostrando la distribución de papilas y anfidios (a). C-E, disposición y división de campos laterales (2, 3, 8, 4, 2), fasmidio (f) localizado después del ano (an). F, terminación de la cola en forma de punta. 43
- Figura 5. Primera generación *Steinernema* sp. A-B, cola de machos mostrando la distribución de doce pares de papilas genitales, una papila ventral (pv) así como mucrón (m) y campos laterales (c). C, región cefálica mostrando el estoma del macho y la hembra; 6 papilas labiales, 4 cefálicas y 2 anfidios (a). D, región anterior de la hembra mostrando el poro excretor (p). E, región posterior de la hembra mostrando el mucrón (m), fasmidio (f), hinchamiento postanal (hp) y ano (a). F, vulva ubicada en la porción media ventral del cuerpo. 46
- Figura 6. Primera generación *Steinernema* sp. A-B región cefálica de machos. C, región posterior con proyección de espículas y mucrón. D, región anterior de la hembra. E, vulva conoide. F, hinchamiento post-anal y mucrón. G, hembra primera generación. H, macho primera generación. I, juvenil infectivo. J, región cefálica proyectándose el bulbo esofágico y el poro excretor. 47
- Figura 7. Espículas y gubernáculum de primera generación de machos. A-B, espículas terminadas en punta roma y con presencia de velum. C-D, 48

gubernáculum.

- Figura 8. Juvenil infectivo. A-B, región anterior mostrando la distribución de papilas y anfidios (a). C-E, disposición y división de campos laterales (2, 3, 8, 4, 2), fasmidio (f) localizado después del ano (an). F, terminación de la cola en forma de punta. 49
- Figura 9. Dibujos en microscopía de campo claro de *Steinernema* sp. A, parte anterior de machos primera generación. B, parte posterior de machos primera generación con terminación en mucrón. C-E, espícula y gubernáculo. F, parte anterior de hembras primera generación. G, región posterior de las hembras primera generación con terminación en mucrón. H, vulva de la hembra en vista dorsal. I, parte anterior de juvenil infectivo. J, terminación de la cola en punta del juvenil infectivo y presencia de fasmidio. 50
- Figura 10. Filogenia de los aislamientos I-23 y III-16 de *Steinernema* spp. obtenido del análisis de Máxima Parsimonia de la región 28S (D2D3). Los aislamientos obtenidos en este estudio se muestran en negrita. Los números de acceso para GenBank de las especies del género *Steinernema* incluidos para comparación y los obtenidos en este estudio se muestran entre paréntesis. Sólo los valores de arranque por encima del 80% se muestran. 66

- Figura 11. Proporción de larvas de *P. polyphylla* Bates infectadas por cada uno 74
de los aislamientos (*H. bacteriophora*, *Steinernema* (I-23) y
Steinernema (III-16).
- Figura 12. Infectividad de *Steinernema* (I-23) sobre larvas de tercer ínstar de 74
gallina ciega. A, larva infectada de *P. polyphylla* Bates. B,
emergencia de nematodos entomopatógenos.
- Cuadro 1. Morfometría de machos y hembras de primera generación y juveniles 54
infectivos de los dos aislamientos de *Steinernema* sp., media \pm DS
(rango) en μm .
- Cuadro 2. Morfometría de machos y hembras de segunda generación de los dos 55
aislamientos de *Steinernema* sp., media \pm DS (rango) en μm .
- Cuadro 3. Comparación de la morfometría de machos primera generación y 56
juveniles infectivos de *Steinernema* (I-23) con otros steinernematidos
afines.
- Cuadro 4. Características morfométricas comparativas de juveniles infectivos, 57
machos y hembras de especies afines a *Steinernema* sp.

GLOSARIO

Anillo nervioso: Forma parte del sistema nervioso y se encuentra rodeando al esófago, justo arriba del bulbo basal.

Bulbo basal: Parte muscular del esófago que se encarga de la succión de los alimentos para llevarlos al intestino.

Calomus: Estructura en forma de cuello en las espículas.

Campo lateral: Ornamentaciones heterogéneas que se presentan en la cutícula de los juveniles infectivos (JI), las cuales presentan algunas incisuras a lo largo del cuerpo, sirviendo además como carácter taxonómico.

Juvenil Infectivo (JI): Estadio larval encargado de buscar al hospedero y que está envuelto por la muda del J2 y presenta grandes cantidades de reservas nutritivas.

Espícula: Órganos genitales, accesorios de penetración ubicada en el extremo de la cola del macho que desembocan en la cloaca. Usualmente pareadas, quitinizadas.

Estoma: Se refiere a la boca o cápsula oral.

Fasmidios: Órganos sensoriales pareados, quimiorreceptores, ubicados en la parte posterior, caudal.

Gubernáculo: Se encargan de guiar a las espículas, para ayudar en la copulación.

Istmo: Región angosta que forma parte del esófago, ubicado entre el metacarpus o bulbo medio y el postcorpus o bulbo basal.

Intestino: Parte del tubo digestivo que realiza la absorción de nutrientes, almacena energía y hace la excreción de residuos.

Manubrio: Cabeza o región anterior de las espículas.

Metacarpus: Forma parte del corpus ubicado entre el procorpus y el postcorpus; también se le conoce como bulbo medio.

Papilas genitales: Proyecciones ubicadas en la región posterior de los machos, cuyo número y posición es considerado como carácter taxonómico.

Patógeno: Es un organismo que produce enfermedad, deformación o incluso la muerte de su hospedero.

Poros excretor: Forma parte del sistema excretor, básicamente osmoregulador (hidratación-deshidratación).

Procorpus: Primera región del esófago que se ubica en el corpus y que se encuentra también antes del bulbo medio.

Septicemia: Infección en la hemolinfa causada por la invasión y multiplicación de bacterias y presencia de toxinas que pueden causar la muerte del insecto.

Simbiosis: Relación estrecha y benéfica entre organismos de diferentes especies. A los organismos involucrados se les denomina simbiote.

Velum: Estructura presente o ausente en machos, hialina/transparente que parte del calomus y suele terminar o no en la punta de la espícula.

ABREVIATURAS

Jl: Juvenil Infección

NEP: Nematodos entomopatógenos

V: Distancia región anterior-vulva

n: Número de individuos medidos

TBL: Longitud del cuerpo (por sus siglas en inglés)

MBW: Anchura máxima del cuerpo (por sus siglas en inglés)

EP: Distancia de la región anterior al poro excretor (por sus siglas en inglés)

NR: Distancia de la región anterior al anillo nervioso (por sus siglas en inglés)

ES: Longitud del esófago (por sus siglas en inglés)

TL: Longitud de la cola (por sus siglas en inglés)

ABW: Diámetro cuerpo-región anal

SpL: Longitud de la espícula (por sus siglas en inglés)

SpW: Anchura de la espícula

GuL: Longitud del gubernáculo (por sus siglas en inglés)

GW: Anchura lateral del gubernáculo

CCL: Número de costillas del campo lateral (por sus siglas en inglés)

p: Poro excretor

a: Ano

f: Fasmidio

m: Mucrón

pv: Papila ventral

c: Campos laterales

hp: Hinchamiento postanal

INTRODUCCIÓN

En México, la principal fuente de ingreso para los agricultores lo constituye los cultivos básicos y las hortalizas ya que de ellos depende el sustento económico de muchas familias. Sin embargo, estos cultivos han sido afectados por una serie de problemas de tipo social, climático, agronómico y fitosanitario.

Uno de los principales factores fitosanitarios que afectan la productividad agrícola lo constituye el complejo de plagas rizófagas como la gallina ciega (Coleoptera: Melolonthidae) (Morón, 2010). Estos insectos están considerados como una de las plagas de mayor importancia económica tanto en el cultivo de maíz (*Zea mays* Vell.), como de otros cultivos agrícolas, forestales y pastizales; constituye una de las plagas de mayor distribución en las áreas cultivadas de la región centro del país (Marín-Jarillo, 2001).

En el estado de Morelos se han reportado pérdidas cercanas al 32% de la producción de grano, calculándose que anualmente se pierden \$57 millones de pesos en un ciclo agrícola (Villalobos *et al.*, 2001; Villalobos *et al.*, 2003). Nájera *et al.* (2003) reportan que en la zona noroeste del estado de Michoacán y otras zonas agrícolas el daño provocado por estos insectos se estima entre el 30 y 40% de la producción de grano de maíz por unidad de superficie (Villalobos *et al.* 2003, Castro-Ramírez *et al.* 2006). En el estado de Guanajuato, 60% de su territorio es de uso agrícola, de este el 80% es empleado para cultivar maíz, sorgo (*Milium sorgo* Garsault), trigo (*Triticum aestivum* L.) y crucíferas, donde la gallina ciega, destaca por su importancia económica (Marín-Jarillo y Bujanos-Muñiz, 2008). Marín-Jarillo y Bujanos-Muñiz (2008), reportan la presencia de 13 especies del género *Phyllophaga* colectadas con trampas de luz negra en once áreas agrícolas del estado de

Guanajuato, las especies corresponden a *P. polyphylla* (Bates), *P. brevidens* (Bates), *P. misteca* (Bates), *P. obsoleta* (Blanchard), *P. porodera* (Bates), *P. ravida* (Blanchard) *P. setifera* (Burmeister) y *P. vetula* (Horn), nocivas en diversos cultivos de este estado.

Debido a las preferencias alimenticias y a los hábitos crípticos de desarrollo del complejo gallina ciega, el control mediante productos químicos ha sido poco eficiente (Nájera, 1993) debido a que no llegan a los sitios donde se alojan las larvas, lo que dificulta su control y encarecen los costos de producción (Herrera, 2006).

Entre las alternativas de manejo de la gallina ciega se mencionan a los nematodos entomopatógenos (NEP), a los que se les ha atribuido potencial para convertirse en el principal agente de control biológico de estas plagas (Lacey y Georgis, 2012). Los Steinernematidae y Heterorhabditidae han recibido mayor atención debido a los diferentes atributos que poseen como agentes de control biológico (Kaya and Gaugler, 1993; Grewal *et al.*, 2005; Koppenhofer, 2007). Poseen un amplio rango de hospederos (Gaugler, 1981), presentan la habilidad de buscar activamente a sus hospederos a los que penetran y matan rápidamente (Kaya y Gaugler, 1993; Liu y Poinar, 2000). La asociación con la bacteria mutualista, *Xenorhabdus spp.* o *Photorhabdus spp.* asociadas a los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis*, les conceden atributos tanto de parásito como patógeno de insectos, además, tienen la ventaja de ser propagados *in vivo* o *in vitro* (Ehlers, 2002), son seguros para vertebrados, plantas y otros invertebrados (Poinar, 1989) y están exentos de registro en Estados Unidos de América (Gorsuch, 1982).

Los NEPs son aislados predominantemente del suelo, hábitat donde se encuentran muchos insectos, principalmente la gallina ciega de la familia Melolonthidae y los picudos

(Coleoptera: Curculionidae). Las larvas de escarabeidos constituyen la principal plaga rizófaga de gramíneas y pastos. El daño que ocasionan estas larvas ha resultado en la implementación de control mediante insecticidas e incrementando el uso de NEPs.

Estudios realizados entre el 2000 y 2003 se encontró un nematodo entomopatógeno de la familia Steinernematidae infectando larvas de gallina ciega de los géneros *Phyllophaga*, *Anomala* y *Cyclocephala* en municipios del sur del estado de Guanajuato (Ramos 2005; Herrera, 2006), considerándose probable el desarrollo de una estrategia con base en el uso de nematodos entomopatógenos que permita regular la población de gallina ciega desde un ámbito ecológico y económico.

En el presente estudio se incluyen resultados de la colecta, la caracterización morfológica y morfométrica así como la determinación taxonómica molecular de nematodos entomopatógenos colectados en la comunidad de Puruagua, municipio de Jerécuaro, Guanajuato. Además, se incluyen resultados de patogenicidad en laboratorio contra larvas del tercer ínstar de *P. polyphylla* Bates.

OBJETIVO GENERAL

Colectar, identificar y evaluar nematodos entomopatógenos nativos que permitan mejorar la sustentabilidad y la aceptabilidad ambiental del manejo de la gallina ciega en el estado de Guanajuato.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener aislamientos puros e identificar los nematodos entomopatógenos presentes en suelos con infestación de larvas de gallina ciega.
- Caracterizar morfológica y morfométricamente a los aislamientos.
- Caracterización molecular de los nematodos aislados.
- Evaluar la susceptibilidad del tercer ínstar de larvas de *P. polyphylla* Bates con cepas nativas de nematodos entomopatógenos.

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

1.1. ESPECIES DE GALLINAS CIEGAS Y DAÑOS EN LOS CULTIVOS

Las gallinas ciegas, por sus hábitos rizófagos, se encuentran entre los insectos del suelo más destructores y problemáticos de casi todas las plantas cultivadas alrededor del mundo; reduciendo el rendimiento de las cosechas por debilitamiento o muerte (Hidalgo *et al.*, 1996). Pérdidas importantes se presentan en los céspedes, de acuerdo con el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), en ese país, la gallina ciega causa un estimado de \$ 234 millones de dólares en daños cada año, \$ 78 millones de dólares son invertidos para el control y un adicional de \$ 156 millones de dólares para la sustitución de césped dañado.

Por su importancia, destaca el género *Phyllophaga* ya que ataca principalmente a Gramíneas (25%), Leguminosas (17%), Rosáceas (17%) (Díaz, 2002) y otros grupos vegetales. Entre los cultivos afectados se han citado pastos, trigo, rosa (*Rubus rosa* L. H. Bailey), plántulas de viveros, papa (*Solanum tuberosum* L.), frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), fresa (*Fragaria x ananassa* Duch), chile (*Capsicum annuum* L.), caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.), acelga (*Beta vulgaris* L.), camote (*Convolvulus batatas* L.), arroz (*Oryza sativa* L.), durazno (*Prunus persica* L. Batsch), garbanzo (*Cicer arietinum* L.), haba (*Vicia faba* L.), jitomate (*Lycopersicon esculentum* L.), manzano (*Malus* spp.), betabel (*Beta vulgaris* L.), zanahoria (*Daucus carota* L.), espinaca (*Spinacia oleracea* L.), cebolla (*Allium cepa* L.), sorgo y maíz (Morón, 1986).

Se ha reportado que *P. obsoleta* Blanchard es la especie de mayor distribución a nivel continental, desde Estados Unidos hasta Guatemala y Nicaragua (Deloya, 1993; Morón,

1997). En la República Mexicana se le encuentra principalmente en los estados de Michoacán, Guerrero, Guanajuato, Nayarit, Jalisco, Sinaloa, México, Puebla, Hidalgo, Morelos, Veracruz, Oaxaca y Chiapas (Morón *et al.*, 1997) afectando diferentes cultivos como acelga, brócoli (*Brassica oleracea* L.), betabel, zanahoria, cilantro (*Coriandrum sativum* L.), cebolla, chile, plantas frutales de vivero, papa (Ramírez-Salinas *et al.*, 1999) y principalmente, maíz (Ramírez-Salinas *et al.*, 1999; Gómez *et al.*, 1999; Villalobos *et al.*, 2001) sin que hasta la fecha se sepa de las cifras exactas de las pérdidas agrícolas que provoca (Romero, 2003). En el norte de Tamaulipas se reporta la especie *P. crinita* como la más importante la cual bajo infestaciones severas causa daños estimados al maíz en más de una tonelada por hectárea (Rodríguez-del-Bosque, 1986).

1.2. MÉTODOS DE CONTROL EMPLEADOS EN GALLINA CIEGA

1.2.1. CONTROL CULTURAL

En la actualidad se manejan prácticas de control cultural las cuales tienen efecto en las poblaciones de gallina ciega y constituyen una alternativa al control químico. La preparación de suelos o rotación de cultivos ha sido utilizada como alternativa para reducir estas poblaciones. Los productores de caña de azúcar en Florida, aparte de hacer inundaciones en sus cultivos, utilizan el arado de discos y con ello, además de matar a las larvas, estas quedan expuestas y sirven de alimento para las aves (Cherry *et al.*, 2001; Cherry y Lentini, 2002). La solarización con plástico transparente ha presentado una cierta acción no cuantificada sobre plagas del suelo (Lim *et al.*, 1980), sin embargo, en Costa Rica han sido probados diferentes tipos de plástico combinados con insecticidas y diatomita

para el control de larvas de gallinas ciega de las especies *Phyllophaga spp.*, *Cyclocephala spp.* y *Anomala spp.* en cultivos de fresa y se ha comprobado que la combinación de plástico transparente con diatomita disminuye significativamente el número de plantas dañadas por estas plagas del suelo (Abarca *et al.*, 1992). Otra de las prácticas para reducir los daños por plagas del suelo es el manejo de la maleza (Díaz, 2002). Bradford *et al.* (1987) reportan que en plantaciones de abeto afectadas severamente por gallina ciega, prácticas como el chaponeo de malezas propician que los árboles presentaran el mayor número de larvas y en consecuencia el mayor daño, en comparación con el tratamiento en donde no se chaponeó la maleza.

1.2.2. CONTROL QUÍMICO

Múltiples ensayos con insecticidas químicos se han evaluado para el control de plagas del suelo (Fuchs *et al.*, 1974; King y Saunders, 1979) como la gallina ciega. De 1986 a 1988 Whitney y Zimmerman (1989) llevaron a cabo ensayos de campo con los insecticidas carbaril (Sevin 80S, Sevin SL), clorpirifos (Dursban 2E), triclofon (Dylox 4L), bendiocarb (Turcam 76W), diazinon (Spectracide) e isazofos (triumph 4E) en el sureste de Colorado, EUA, controlando un 60% de larvas del último ínstar de *P. polyphylla* sp. y *Phyllophaga* sp. en césped. Entre 1977 y 1982, McBride (1984) evalúa la eficiencia de insecticidas contra plagas de la raíz del maíz *P. anixia* Lec. y *P. implícita* (Horn) en Dakota del Norte, EUA, arrojando como resultado que el Terbufos aplicado en bandas sobre el surco al tiempo de la siembra, es tan efectivo como Furadán y el Temik. Koppenhofer y Fuzy, 2007, consideran que los insecticidas Neonicotinoides (imidacloprid, clotianidin) son menos

tóxicos que los organofosforados y carbamatos, pero solo son efectivos cuando son usados en forma preventiva. Sin embargo, su aplicación en grandes áreas puede ocasionar cambios en la fauna nativa, incluyendo los enemigos naturales e incrementar la dependencia en el control químico.

1.2.3. CONTROL BIOLÓGICO

Control biológico se define como la acción de depredadores, parásitos y patógenos los cuales mantienen la densidad de población de otro organismo a un nivel más bajo de aquel que ocurriría en su ausencia (Van den Bosch y Messenger, 1973). Es por ello que se le considera como uno de los métodos más antiguos y eficaces conocidos por el hombre puesto que los insectos que atacan a los cultivos, muchas veces son a su vez atacados por enemigos naturales (N. A. S., 1971). Mediante el manejo integrado de plagas, utilizando principalmente enemigos naturales, se pueden reducir las pérdidas ocasionadas por la gallina ciega. Desafortunadamente, en México, poca información se ha generado sobre los enemigos naturales del género *Phyllophaga*, sobre todo de especies que llegan a comportarse como plagas agrícolas (Gómez *et al.*, 2000, Castro-Ramírez y Ramírez-Salinas, 2001).

1.2.3.1. LOS PARASITOIDES EN EL CONTROL DE LA GALLINA CIEGA

Varias especies han sido identificadas parasitando poblaciones de gallina ciega. Avispitas del género *Tiphia* (Hymenoptera: Tiphidae) son de los taxones predominantes en parasitar

estas plagas del suelo (Clausen, 1940). Tan solo en América del Norte están presentes 100 especies (Krombein, 1979), sin embargo, pocos estudios se han realizado sobre su biología (Rogers y Potter, 2004). De 1920 a 1930, en los Estados Unidos de América, se liberaron siete especies exóticas importadas de avispidas del género *Tiphia* y solo dos especies, *Tiphia popilliavora* Rohwer y *T. vernalis* Rohwer, se establecieron y proporcionaron un control sobre *Popilla japonica* Newman y desde la década de los 60's no se ha publicado sobre la propagación de *Tiphia* y su contribución en el control de las poblaciones de larvas (Ladd y McCabe, 1966; Clausen, 1978; Rogers y Potter, 2004). En un estudio realizado por Rivers *et al.*, (1979), se determinó la tasa de parasitismo de *T. berbereti* Allen sobre larvas de tercer ínstar de *P. anxia* variando considerablemente de un año a otro y de una zona a otra en prados de heno en los condados de Cherry y el Condado de Rock, Nebraska, USA. Para el condado de Cherry la tasa media de parasitismo fue del 30% durante 1974 y 25% para 1975 pero disminuyó 12% en 1976. La población de larvas de *P. anxia* disminuyó de 50-80 por m² a 20-40 por m² de 1974 a 1976. En el condado de Rock la tasa media de parasitismo varió menos del 1% en 1975 al 2.3% durante 1976. En un estudio de 4 años realizado por Poprawski (1994), determina que 29 especies (pertenecientes a 13 familias en 3 órdenes) de parasitoides y depredadores se encuentran asociados con la plaga *P. anxia* (LeConte) presente en céspedes en la provincia de Quebec, Canadá; especies de moscas de la familia Tachinidae (Diptera: Tachinidae) y avispidas de la familia Tiphidae fueron los parásitos más comunes.

Durante los meses de mayo a octubre del 2002 y de junio a septiembre del 2003, Ramírez-Salinas *et al.*, (2006) recolectaron escarabajos adultos de *P. rufotestacea* en parcelas agrícolas (no se encontraron larvas) y arbolado en el sur de San Cristóbal de las Casas,

Chiapas parasitados por *Crytomeigenia* (Diptera: Tachinidae). De 1385 escarabajos adultos recolectados en 2002, 564 fueron hembras y 821 machos, de estos últimos el 26.9% estuvo parasitado. En la recolecta de 2003 se encontró el 25.17% de machos parasitados y 15.58% en hembras. En ese mismo año comprobaron que el parasitismo está presente en todo el periodo de vuelo de *P. rufotestacea* (del 9 de junio al 8 de septiembre), variando en ese tiempo el porcentaje de organismos afectados (de cero a 38.7%).

1.2.3.2. LAS BACTERIAS ENTOMOPATÓGENAS EN EL CONTROL DE LA GALLINA CIEGA

La existencia de patógenos naturales de larvas de gallina ciega ha sido señalada desde hace varias décadas, como es el caso de las bacterias. Hasta el momento se conocen 3 especies (*Bacillus thuringiensis*, *B. sphericus* y *Paenibacillus popilliae*) con posibilidad de ejercer control sobre insectos en los órdenes Díptera, Ortóptera, Hymenóptera y Coleóptera (Badii y Abreu, 2006).

Desde su aislamiento en 1940 por el estadounidense Samuel Dutky, la especie *B. popilliae*, ahora *Paenibacillus popilliae* (Pettersen *et al.*, 1999), es uno de los patógenos más conocidos en el control biológico de insectos (Klein y Jackson, 1992). Las diversas cepas de *P. popilliae* atacan a más de 70 especies de gallina ciega (larvas de escarabajos) causando la llamada “enfermedad lechosa” (Ibarra, 2007). Algunas de las especies de escarabeidos reportadas por Dutky (1941) que han mostrado ser susceptibles a *P. popilliae* figuran: *C. borealis*, *Autoserica castanea*, *A. orientalis*, *P. anxia*, *P. ephilida*, *P. bipartita*, *P. rugosa*, *P. fusca*, *Strigoderma arborícola* y *Strigoderma pygmaea*.

Desafortunadamente en México, las gallinas ciegas de importancia agrícola (*Phyllophaga*, *Anomala* y *Cyclocephala*) presentan baja o nula susceptibilidad a las cepas conocidas de esta bacteria (Ibarra, 2007).

En Costa Rica fue encontrado un complejo de bacterias nativas identificadas como *B. cerus* y *Erwinia spp.*, mediante pruebas de patogenicidad *in vitro* y en campo se obtuvo 100% de mortalidad en huevos y larvas de primero, segundo y tercer ínstar de las especies *P. menetriesi* y *P. obsoleta*, mismas que fueron criadas en condiciones controladas (Vargas y Abarca, 1991).

En un experimento realizado en Nebraska por Jarvis (1966), demostró que las larvas del segundo y tercer ínstar de *P. anxia*, son susceptibles a la enfermedad lechosa al colocarlos en suelo inoculado con esporas comerciales de *P. popilliae* a una dosis de 1×10^9 esporas/kg por un periodo de treinta días.

1.2.3.3. LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS EN EL CONTROL DE LA GALLINA CIEGA

Los hongos entomopatógenos se han desarrollado como una importante estrategia dentro del contexto de manejo integrado de plagas (Lord, 2005; Roy *et al.*, 2006; Khachatourians 2008). Existen trabajos donde se reporta patogenicidad de hongos entomopatógenos sobre larvas del género *Phyllophaga* como los realizados por Poprawski y Yule (1991). Estos autores reportan a *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin y *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin var. *anisopliae* provocando mortalidad de larvas de *Phyllophaga*

spp. *B. bassiana* ocasionó niveles de mortalidad de 24%, mientras que *M. anisopliae* mató entre el 82 y 97% de las larvas de segundo y tercer ínstar respectivamente a bajas dosis.

Flores *et al.*, (2002), al realizar bioensayos de laboratorio con cepas de *B. bassiana* a una concentración letal (LC₅₀) de 1.15×10^9 con/g y 1.29×10^8 con/g de *M. anisopliae* contra larvas de tercer ínstar de *Phyllophaga* spp. en el estado de Chiapas, reportan una mayor mortalidad con *M. anisopliae* con 21.6 a 90.0% que *B. bassiana* con 28.3 a 61.6% a los 30 días después de la inoculación.

Tres aislamientos de *M. anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (M493, M492 y M498) obtenidos de *Phyllophaga* sp. en cultivos de maíz en el estado de Jalisco así como uno de *B. bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Bb50) obtenido de *Galleria mellonella* en cultivo de caña de azúcar en el estado de Nayarit y que pertenecen a la colección del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB-DGSV-SAGARPA) fueron evaluados para uso potencial como agentes de control biológico contra larvas de tercer ínstar de *P. crinita* (Burm.), plaga rizófaga de gran importancia económica en el sureste de Estados Unidos y noreste de México. Los aislamientos fueron evaluados a una concentración de 2×10^8 con/g durante 30 días. El aislamiento M498 fue el más virulento con un registro de mortalidad de 80% seguido de M492 con 54%, Bb50 con 49% y por último M493 con 25%, lo que indica que *M. anisopliae* es un agente de control microbiano con potencial para ser incluido en programas de manejo integrado de la gallina ciega, tanto en parcelas agrícolas como en áreas urbanas (Nájera-Rincón *et al.*, 2005).

Guzmán-Franco *et al.* (2011), realizaron experimentos para estudiar la virulencia de cepas de *B. bassiana* y *M. anisopliae* contra larvas de tercer ínstar de *P. polyphylla* y *A. cincta*,

provenientes del estado de Guanajuato; 24 larvas de ambas especies se inocularon en una suspensión de conidios (1×10^8 conidios ml^{-1}) por 20s. Después de 36 días de incubación, las larvas de *A. cincta* mostraron mayor susceptibilidad a cepas de *M. anisopliae* con un 90% de infección mientras que en *P. polyphylla* la infección fue del 20%. En contraste, *B. bassiana* causó el mayor porcentaje de infección en larvas de *P. polyphylla*, demostrando que hay una interacción significativa entre el aislamiento y la especie de larvas.

1.2.3.4. LOS NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS EN EL CONTROL DE LA GALLINA CIEGA

Los nematodos entomopatógenos, principalmente de las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae, ofrecen una alternativa no tóxica, ambientalmente segura. Estos nematodos son habitantes del suelo y son utilizados como agentes de control biológico principalmente de insectos habitantes en el suelo (Gaugler, 1981; Poinar, 1979; Wassink y Poinar, 1984). El uso de nematodos entomopatógenos se dio con el aislamiento de *S. glaseri* (Steiner, 1929) encontrado en la gallina ciega, *Popillia japonica* (Newman) en Nueva Jersey, este fue el primer reporte del uso de entomopatógenos para el control de plagas rizófagas (Glaser, 1932). Subsecuentemente se han realizado estudios tendientes a identificar y evaluar otras especies que permitan disminuir las poblaciones del complejo gallina ciega.

En Carolina del Norte, Estados Unidos de América, de 1983 a 1985 Bradford *et al.* (1988), evaluaron en campo y laboratorio los nematodos *S. feltiae* (Filipjev), *S. glaseri* (Steiner) y *Heterorhabditis heliothidis* (Klan, Brooks, and Hirschmann) contra *P. anixia* (LeConte), *P.*

fusca (Froelich) y *P. comes* (Casey). En pruebas de laboratorio, las diferentes especies de nematodos demostraron virulencia similar, ocasionando mortalidad entre 60-80% en 2 a 4 días; sin embargo en campo, los resultados fueron irregulares.

En pruebas de laboratorio efectuadas en Colombia, se evaluó durante 10 y 20 días el efecto de los aislamientos nativos *Heterorhabditis bacteriophora* (HNI-Cenicafé) sobre la mortalidad de diferentes instares de *P. menetriesi* y *A. inconstans* y *S. feltiae* (Sf-Villapinzón) en *A. inconstans* a una concentración de 10,000 IJs/ml. El aislamiento HNI causó la mayor mortalidad en un 84.7% frente a Sf con un 76.7% para los diferentes instares de *A. inconstans*, aunque el segundo instar fue más susceptible con el primer aislamiento (98.3%). La mayor mortalidad de *P. menetriesi* se presentó a los 20 días con el aislamiento HNI siendo también el segundo instar el más susceptible con un 81.1%. Con esto se determinó que la susceptibilidad de las gallinas ciegas a los nematodos entomopatógenos depende tanto de su especie como del aislamiento utilizado del entomopatógeno (Melo-Molina *et al.*, 2007).

Quintero-Marin *et al.*, (2006), al evaluar la infectividad (porcentaje de penetración) y porcentaje de patogenicidad de tres nematodos entomopatógenos nativos (*Heterorhabditis* (INS 0100 y sp-CIAT) y *Steinernema* (SIN 0198)) sobre larvas de tercer instar de *P. menetriesi* (Blanchard) en concentraciones de 7,000 y 13,000 JI por ml y se observó que SIN 0198 mostraba un mayor porcentaje de infectividad (> 80%) pero no de patogenicidad. En contraste, los tratamientos INS 0100 y sp-CIAT, a pesar de tener el menor grado de infectividad (52.9%), presentaron una mayor porcentaje de patogenicidad (31.6%). Por lo que los aislamientos de *Heterorhabditis* fueron considerados los más promisorios para ser

integrados en un manejo de plagas. Sin embargo, diferentes aislamientos y especies de nematodos nativos deben ser evaluados sobre todas las etapas de desarrollo de la plaga.

Una nueva especie de nematodo entomopatógeno, *S. scarabaei*, aislado de las larvas de gallinas ciegas en New Jersey, ha demostrado virulencia inusual contra varias especies de larvas de gallinas ciegas. En condiciones de laboratorio y de invernadero, *S. scarabaei* demostró ser altamente patogénico sobre *P. japonica*, *A. orientalis* y *Rhizotrogus majalis*, pero no en *C. borealis*. Además, ejerció un excelente control de *P. japonica*, *A. orientalis* y *C. borealis* bajo condiciones de campo (Koppenhofer y Fuzy, 2003).

S. scarabaei junto con *S. glaseri*, *H. bacteriophora* y *H. marelatus* fueron evaluados (Cappaert y Koppenhofer, 2003), sobre *R. majalis* y *P. japonica* de tercer ínstar. En ensayos de laboratorio *S. scarabaei* causó mayor mortalidad comparada con *H. bacteriophora*, con una LC_{50} de 5.5-6.0 y 5.7 juveniles infectivos (JIs) por larva de *R. majalis* y *P. japonica* respectivamente. En un ensayo bajo invernadero, *S. scarabaei* proporcionó mayor mortalidad sobre *R. majalis* en todas las dosis aplicadas ($0.156-1.25 \times 10^9$ JIs/ha) comparados con *S. glaseri* y *H. bacteriophora* (ambos a 1.25×10^9 JIs/ha). Además, en pruebas de campo durante el otoño, *S. scarabaei* proporcionó 75 a 88% de control sobre *R. majalis* en 2.5×10^9 y 10^9 JIs/ha, y un 54% de control sobre *P. japonica* (10^9 JIs/ha); *H. bacteriophora* no tuvo ningún efecto en la mortalidad de ambas especies de gallina ciega. En pruebas de campo durante la primavera, las temperaturas frescas impidieron la actividad de los nematodos. Contra *R. majalis*, *S. scarabaei* proporcionó un control moderado de 56-59%, mientras que *H. marelatus* no proporcionó ningún control; La mortalidad de *P. japonica* fue moderada (49-66%) tanto en *S. scarabaei* y *H. marelatus*.

En general, *S. scarabei* muestra un potencial excepcional para el control biológico del complejo gallina ciega (Koppenhofer y Fuzy, 2003).

No todos los aislamientos de nematodos entomopatógenos muestran un alto potencial para el control de las diferentes especies de gallina ciega; Por ejemplo en Irán, Javad Karimi *et al.* (2010) indican que, *H. bacteriophora* Iran 1, *S. glaseri* Iran 2 y *S. carpocapsae* Iran 3, contra *Polyphylla olivieri*, solamente *S. carpocapsae* Iran 3, con una DL50 de > 10000 JIs/larva, causó 16% de mortalidad después de 25 días. Además, al evaluar su tolerancia al calor, se demostró que, de las tres especies de nematodos entomopatógenos, *H. bacteriophora* Iran 1 fue la más tolerante a 32 °C, pero no pudo sobrevivir a 36 °C después de 4 a 5 horas de exposición.

Parvizi (2001; citado por Javad Karimi *et al.*, 2010) llevó a cabo una prueba de infectividad de *H. bacteriophora* y *Steinernema* sp. contra la gallina ciega *P. olivieri*. Ambas especies fueron aisladas en suelos de la Provincia de West Azerbaijan, Irán. En este estudio se demostró que los JIs con una concentración de $5 \times 10^5/m^2$ pueden causar una mortalidad media de 33.8%, y 45.87% en larvas de tercer ínstar.

En México son pocas las experiencias documentadas sobre el uso de nematodos como agentes de control biológico de insectos plaga. Los trabajos existentes se han enfocado a la búsqueda de nuevos aislamientos, y pruebas para determinar su potencial contra plagas del suelo en condiciones de campo e invernadero.

1.3. LITERATURA CITADA

Abarca, G., Vargas, E. y Mata, R. 1992. Alternativas de combate del complejo de larvas de jobotos *Phyllophaga* spp., *Anomala* spp. y *Cyclocephala* spp.) (Col: Scarabaeidae) en fresa (*Fragaria ananassa*). Agronomía Costarricense 16(1):45-54.

Baddi, M. H. and J. L. Abreu. 2006. Biological control a sustainable way of pest control. Daena: International Journal of Good Conscience. 1(1): 82-89.

Bradford, M. R. K., Fred, P. H. and Wayne, M. B. 1987. White grub (Coleoptera: Scarabaeidae). Densities, Weed control practices, and root Damage to Fraser fir Christmas Trees in the Southern Appalachians. Journal Economic Entomology 80 (5): 1072-1075.

Bradford, M. R. K., Fred, P. H. and Wayne, M. B. 1988. Field Suppression of Three White Grub Species (Coleoptera: Scarabaeidae) by the Entomogenous Nematodes *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis heliothidis*. Journal Economic Entomology. 81 (4): 1033-1039.

Cappaert, D. L. and Koppenhofer, A. M. 2003. *Steinernema scarabaei*, an entomopathogenic nematode for control of the European chafer. Biological Control. 28: pp. 379-386.

Castro-Ramírez, A. E. y C. Ramírez-Salinas. 2001. Enemigos naturales de *Phyllophaga obsoleta* en San Cristóbal de Las Casas, Chiapas. Pp: 103. In: S. G. Stanford, A. Morales, J. Padilla & M. Ibarra (Eds.). XXXVI Congreso Nacional de Entomología y XXVIII Congreso Nacional de Fitopatología. ITESM. Querétaro, México.

Castro-Ramírez, A. E., H. R. Perales-Rivera, y V. Parra-Tabla. 2006. Propuesta metodológica para la evaluación del daño ocasionado por "gallina ciega" (Coleoptera) al

maíz (*Zea mays* L.), pp. 163-180. In A. E. Castro-Ramírez, M. A. Morón, y A. Aragón [eds.], *Diversidad, Importancia y Manejo de Escarabajos Edafícolas*. ECOSUR, Fundación PRODUCE Chiapas, BUAP. Puebla, México.

Cherry, R. H., Schueneman, T. J., and Nuessly, G. S. 2001. *Insect Management in Sugarcane*. Entomology and Nematology Department document ENY-406. University of Florida/IFAS, Gainesville, FL 32611.

Cherry, R. H. and Lentini, R. S. 2002. *White Grubs in Florida Sugarcane*. Entomology and Nematology Department document ENY-664. University of Florida/IFAS, Gainesville, FL 32611.

Clausen, C. P. 1940. *Entomophagous insects*. McGraw-Hill, New York.

Clausen, C. P. 1978. Scarabaeidae, pp. 277-292. In C. P. Clausen (ed.), *Introduced parasites and predators of arthropod pests and weeds: a world review*. Agriculture Handbook No. 480. U. S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Washington, DC.

Deloya, C. 1993. El género *Phyllophaga* Harris en Cuernavaca, Morelos, México (Coleoptera: Melolonthidae, Melolonthinae). En: *Diversidad y Manejo de plagas subterráneas* (M.A. Morón, comp.). Publicación especial de la Sociedad Mexicana de Entomología e Instituto de Ecología, México. pp. 39-54.

Díaz, M. P. 2002. Abundancia y distribución de especies de “gallina ciega” (Coleoptera: Melolonthidae), hongos (Hyphomycetes) y nematodos (Nematoda: Heterorhabditidae) entomopatógenos en los Altos de Jalisco, México. Universidad de Colima. Colima, Col., México. 94 pp.

Dutky, S. R. 1941. Susceptibility of certain scarabaeid larvae to infection by Type A milky disease. *J. Econ. Entomol.* 34(2): 215-216.

Ehlers, R.U. 2002. Nematodos entomopatógenos para el control de insectos. *Phytoma España* 144: 77-81.

Flores, A. G., De la Rosa, W., Rojas, J. C. and Castro-Ramírez, A. E. 2002. Evaluation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Mitosporic) Against Species of the “White Grub Complex” in the South of Mexico. *Southwestern Entomologist*. Vol. 27 No.1. 73-83.

Fuchs, T. W., Harding J. A. and Dupnik T. 1974. New Technique for Evaluation of Insecticides Against *Phyllophaga crinita*. *Journal Economic Entomology* 67 (3): 455-456.

Gaugler, R. 1981. Biological control potential of neoaplectanid nematodes. *J. Nematol.* 13(3): 241: 249.

Girón, P. S. 2008. Evaluación de dos formulaciones de nematodos entomopatógenos para el control de gallina ciega *Phyllophaga vetula* en maíz. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca del IPN. Santa Cruz Xoxocotlán, Oax., México. 107 pp.

Glaser, R. 1932. Studies on *Neoaplectana glaseri*, a nematode parasite of the Japanese beetle (*Popillia japonica*). New Jersey Department of Agriculture. Circular 211. Trenton, NJ. 34 p.

Gómez, B., A. Castro, Ch. Junghans, L. Ruíz Montoya and F. J. Villalobos. 2000. Ethnoecology of white grubs (Coleoptera: Melolonthidae) among the tzeltal maya of

Chiapas. *J. Etnobiol.* 20(1): 43-59.

Gómez, B., F.J. Villalobos, L. Ruíz y A. Castro-Ramírez. 1999. Observaciones sobre la biología de melolóntidos (Coleoptera: Scarabaeoidea) en una localidad de los Altos de Chiapas, México. *Acta Zool. Mex.* 78: 173-177.

Gorsuch, A. M. 1982. Regulations for the enforcement of the federal insecticide, fungicide, y rodenticide act exemption for regulation of certain biological control agents. *Fed. Regist.* 47, 23928-30.

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

Guzmán-Franco, A. W., Hernández-López, J., Enríquez-Vara, J. N., Alatorre-Rosas, R., Tamayo-Mejía, F. and Ortega-Arenas, L. D. 2011. Susceptibility of *Phyllophaga polyphylla* and *Anomala cincta* larvae to *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates, and the interaction with soil properties. *BioControl.* DOI 10.1007/s10526-011-9421-3.

Herrera, N. E. G. 2006. Steinernematidos Nativos Asociados a “Gallina Ciega” (*Phyllophaga spp.*, *Clyclocephala spp.*, *Anomala spp.*) en Guanajuato y Estado de México. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México. pp: 166.

Hidalgo, E., Smith, S., Shannon, P. 1996. Metodología para la cría masiva de *Phyllophaga spp.* (Coleoptera: Scarabaeidae). VI. Congreso Internacional de Manejo Integrado de Plagas. Acapulco, Gro. México. p. 107.

Ibarra, J. E. 2007. Uso de bacterias en el control biológico, pp. 144-159. *En*: L. A. Rodríguez-del-Bosque y H. C. Arredondo-Bernal (eds.), *Teoría y Aplicación del Control Biológico*. Sociedad Mexicana de Control Biológico, México. 303 p.

Jarvis, J. L. 1966. Studies of *Phyllophaga anxia* (Coleoptera: Scarabaeidae) in the sandhills area of Nebraska. *J. Kans. Entomol. Soc.* 39: 401-409.

Javad-Karimi, Tahmineh-Safari and Kharazi-Pakdel, A. 2010. Status of entomopathogenic nematodes researches in Iran. *Journal of Biopesticides*, 3(2): 474-478.

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

King, A. B. y Saunders, J. L. 1979. El control de la gallina ciega (*Phyllophaga* sp.) en maíz con insecticidas aplicados por métodos sencillos. *Turrialba* 29: 17-19.

Khachatourians, G. G. 2008. Insecticides, microbial. In: Schaecter M, Summers WC et al (eds) *Encyclopedia of microbiology*, vol 2, 3rd edn. Elsevier, New York.

Klein, M. G. y Jackson, T. A. (1992). Bacterial diseases of scarabs. pp. 43-61 in T. A. Jackson y Glare T. R. (Eds). *Use of Pathogens in Scarab Pest Management*. Intercept Ltd., Andover. 179 p.

Koppenhofer, A. M. and Fuzy, E. M. 2003. *Steinernema scarabaei* for the control of white grubs. *Biological Control*. 28(1): 47-59.

Koppenhofer, A. M. 2007. Nematodes. Pp. 249–264 in L. A. Lacey and H. K. Kaya, eds. *Field manual of techniques in invertebrate pathology: Application and evaluation of*

pathogens for control of insects and other invertebrate pests, second ed. Dordrecht: Springer.

Koppenhofer, A. M., and E. M. Fuzy. 2007. Nematodes for White Grub Control. Rutgers University. Green Section Record. 26-31 p.

Krombein, K. V. 1979. Family Tiphidae, pp. 1253-1261. In K. V. Krombein, P. Hurd, D. R. Smith, and B. D. Burks (eds.), Catalog of Hymenoptera in America North of Mexico, vol. 2. Smithsonian Institution Press. Washington, DC.

Lacey, L. A. and Georgis, R. 2012. Entomopathogenic Nematodes for Control of Insect Pests Above and Below Ground with Comments on Commercial Production. Journal of Nematology 44(2):218–225. 2012.

Ladd, T. L., and P. J. McCabe. 1966. The status of *Tiphia vernalis* Rohwer, a parasite of the Japanese beetle, in southern New Jersey and southeastern Pennsylvania in 1963. J. Econ. Entomol. 59: 480.

Lim, K. P., Stewart, R. K., Yule, W. N. (1980). A historical review of the bionomics and control of *Phyllophaga anixia* (Le Conte) (Coleoptera: Scarabaeidae), with special reference to Quebec. Annales de la Società Entomologique du Québec 25 (3): 163-178.

Liu, J., y Poinar, G. O. Jr. 2000. Control of insect pest with entomopathogenic nematodes: the impact of molecular biology and phylogenetic reconstruction. Annual review Entomology, 45, 287-306.

Lord, J. C. 2005. From Metchnikoff to Monsanto and beyond: the path of microbial control. J. Invert. Pathol. 89:19–29.

Marín-Jarillo, J. A. 2001. Abundancia del complejo “gallina ciega” (Coleoptera: Melolonthidae) Asociado al Cultivo de Maíz en el centro de México. Agricultura Técnica en México. Vol. 27 No. 2 pp. 119-131.

Marín-Jarillo, A. y Bujanos-Muníz. 2008. Especies del complejo “Gallina Ciega” del género *Phyllophaga* en Guanajuato, México. Agricultura Técnica en México. Vol. 34 Núm. 3. P. 349-355.

McBride D. K. 1984. White grub control trials in corn. North-Dakota-Farm-Research 41 (6): 8-10.

Melo-Molina, E. L., Ortega-Ojeda, C. A. y Gaigl, A. 2007. Efecto de nematodos sobre larvas de *Phyllophaga menetriesi* y *Anomala inconstans* (Coleoptera: Melolonthidae). Revista Colombiana de Entomología. 33 (1): 21-26.

Morón, M. A. 1986. El género *Phyllophaga* en México. Morfología, distribución y sistemática supraespecífica. Publ. 20. Inst. de Ecología, México. 342 pp.

Morón, M. A. 1997. White grubs (Coleoptera: Melolonthidae: *Phyllophaga* Harris) in México and Central América. A brief review. Trends in Entomology. 1: 117-128.

Morón, M. A.; Ratcliffe, B. C y Deloya, C. 1997. Atlas de los escarabajos de México. Coleóptera: Lamellicornia Vol. I Familia Melolonthidae. Comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad y sociedad mexicana de entomología. México, D. F. 280 p.

Morón M. A. 2010. Diversidad y Distribución del Complejo “Gallina Ciega” (Coleoptera: Scarabaeoidea). En L. A. Rodríguez del Bosque y M. A. Morón (eds.). Plagas del suelo. INIFAP. ISBN 978-607-7699-06-4. PP: 41-63.

Nájera, R. M. B. 1993. Coleopteros Rizófagos Asociados al Maíz de Temporal en el Centro del Estado de Jalisco, México: Identificación, Ecología y Control *in*: Diversidad y Manejo de Plagas Subterráneas. 257 p.

Nájera, M. B., T. A. Jackson y J. D. López-Mora. 2003. Especie de “gallina ciega” (Coleoptera: Melolonthidae) asociados al cultivo de maíz en tres localidades de la ciénega de Zacapu, Michoacán, México. En: Estudios sobre coleópteros del suelo en América.

Nájera-Rincón, M. B., García-Martínez, M., Crocker, R. L., Hernández-Valdéz, V. y Rodríguez del Bosque, L. A. 2005. Virulencia de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, Nativos del Occidente de México, Contra Larvas de Tercer Estadio de *Phyllophaga crinita* (Coleoptera: Melolonthidae). Fitosanidad vol. 9, no. 1. 33-36.

National Academic of Sciences (N. A. S.). 1971. Manejo y control de plagas de insectos. Vol. 3. Ed. Limusa. 522 pp (7-10).

Petterson, B., K. E. Rippere, A. A. Yousten, and F. G. Priest. 1999. Transfer of *Bacillus lentimorbus* and *Bacillus popilliae* to the genus *Paenibacillus* with emended descriptions of *Paenibacillus lentimorbus* comb. nov. and *Paenibacillus popilliae* comb. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 49: 531-540.

Poinar, G. O. Jr. 1979. Nematodes for biological control of insects. (CRC. Press. Boca Raton) USA. pp. 49-57.

Poinar, G. O. Jr. 1989. Non-insect host for the entomogenous rhabditid nematodes *Neoaplectana* (Steinernematidae) and *Heterorhabditis* (Heterorhabditidae). *Revue de Nématologie*, 12, 423-428.

Poprawski, T. J. 1994. Insect parasites and predators of *Phyllophaga anxia* (LeConte) (Col., Scarabaeidae) in Quebec, Canada. *J. Appl. Ent.* 117, 1-9.

Poprawski, T. J. and Yule, W. N. 1991. Incidence of fungi in natural populations of *Phyllophaga* spp. and susceptibility of *Phyllophaga anxia* (Le Conte) (Coleoptera: Scarabaeidae) to *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina). *J. Appl. Ent.* 112: 359-365.

Quintero-Marin, P., Caicedo, A. M., Montoya-Lerma, J. and Gaigl, A. 2006. Evaluation of three native entomopathogenic nematodes (Rhabditidae) against third instar larvae of *Phyllophaga menetriesi* (Coleoptera: Scarabaeidae). *International Journal of Tropical Insect Science*. 26: pp 233-238.

Ramírez-Salinas, C., I. Arredondo y A. Castro-Ramírez. 1999. Biología y comportamiento de *Phyllophaga (Phytalus) obsoleta*, en la región Altos de Chiapas, México. 1993-1995. En: *Memorias del XXXIV Congreso Nacional de Entomología*. Aguascalientes, Ags., México. pp. 177-182.

Ramírez-Salinas, C., C. Pacheco-Flores y A. E. Castro-Ramírez. 2006. *Cryptomeigenia* sp. (Diptera: Tachinidae) como Parasitoide de adultos de *Phyllophaga (Phytalus) rufotestacea* (Moser, 1918) (Coleoptera: Melolonthidae) en Chiapas, México. *Acta Zoológica Mexicana* (n. s.) 22(1): 1-8.

Ramos Martínez Jose Antonio. 2005. Fluctuación del complejo Melolonthidae (Coleoptera) en patizales, en asociación con sus enemigos naturales en Tarandacua y Jerécuaro, Guanajuato. Tesis de Maestro en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Entomología y Acarología

Rivers, R. L., Z. B. Mayo y T. J. Helms. 1979. Biology, Behavior and Description of *Tiphia berbereti* (Hymenoptera: Tiphidae) a Parasite of *Phyllophaga anxia* (Coleoptera: Scarabaeidae). Journal of the Kansas Entomological Society. 52(2). pp. 362-372.

Rodríguez-del-Bosque, L. A. 1986. Simulated damage to the root system of maize: a tool in the search for varietal tolerance against soil pests. Agricultura Técnica en México 12 (1): 121-134.

Rogers, M. E. and D. A. Potter. 2004. Biology of *Tiphia pygidialis* (Hymenoptera: Tiphidae), a Parasitoid of Masked Chafer (Coleoptera: Scarabaeidae) Grubs, with Notes on the Seasonal Occurrence of *Tiphia vernalis* in Kentucky. Entomological Society of America. Environ. Entomol. 33(3) : 520-527.

Romero, L. A. A. 2003. Ecología química del escarabajo *Phyllopha obsoleta* (Coleoptera: Melolonthidae). Yautepec, Morelos, México. pp: 86.

Roy, H. E., Steinkraus, D. C., Eilenberg, J., Hajek, A. E. and Pell, J. K. 2006. Bizarre interactions and endgames: entomopathogenic fungi and their arthropod hosts. Annu Rev Entomol 51:331–357.

Steiner, G. 1929. *Neoaplectana glaseri* n. g., n. sp. (Oxyuridae) A new nemtic parasite of the japanese beetle (*Popillia japonica* Newm). J. Wash. Acad. Sci. 19: 436-440.

Van den Bosch, R. and Messenger, P. S. 1973. *Biological control*. New York, NY, USA,

Intext. 180 pp.

Vargas, E. y Abarca, G. 1991. Patogenicidad de *Bacillus cereus* y *Erwinia spp.* sobre Jobotos del Género *Phyllophaga spp.* (Col.: Scarabaeidae). *Agronomía Costarricense*: 15(1/2): 157-162.

Villalobos, F. J., A. A. Romero-López y M. E. Núñez-Valdez. 2001. Diagnóstico del problema causado por gallina ciega en cultivos de maíz del Estado de Morelos. En: *Memorias del 1er. Simposium de Manejo Integrado de Plagas del Estado de Morelos*. UAEM, Cuernavaca, Morelos, México. 47 pp.

Villalobos, F. J., R. Vásquez-Govea, A. A. Romero-López, y M. E. Núñez-Valdez. 2003. La labranza de conservación y la agrobiotecnología como propuesta de manejo sustentable de la gallina ciega (Coleoptera: Scarabaeidae) en cultivos de maíz (*Zea mays*) de Morelos, pp. 313-326. *In* A. Aragón y M. A. Morón [eds.], *Estudios Sobre Coleópteros del Suelo en América*. Pub. especial BUAP, Puebla, México.

Wassink, H. y Poinar, G. O. Jr. 1984. Nematological reviews—use of the entomogenous nematode, *Neoplectana carpocapsae* Weiser (Steinernematidae Rhabditida), in Latin America. *Nematropica* 14: 97-110.

Whitney, S. C. and R. J. Zimmerman. 1989. Biological, Mechanical, and Chemical Control of Turfgrass-Infesting Scarabs in Colorado. *Southwestern Entomologist*. 14 (4): 351-355.

CAPÍTULO 2. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MORFOMÉTRICA DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS (NEMATODA: STEINERNEMATIDAE) COLECTADOS EN GUANAJUATO, MÉXICO

Los nematodos entomopatógenos (NEP) están considerados actualmente como una de las alternativas con más futuro para el control de insectos ya que poseen características comunes a depredadores, parasitoides y patógenos (Gaugler y Kaya, 1990; Poinar, 1990). Los nematodos de la familia Steinernematidae son de los más importantes grupos de agentes de control biológico de insectos del suelo (Wassink y Poinar, 1984). Sin embargo dentro del complejo gallina ciega, en ensayos de campo, la familia Steinernematidae ha sido eficiente en menos del 50% (Waschke *et al.*, 1995), además, cuando son aplicados en condiciones de laboratorio, son capaces de causar la muerte del hospedero en 24 - 48 h (Georgis y Gaugler, 1991); pero los resultados son impredecibles cuando se aplican en condiciones naturales. La identificación de poblaciones nativas adaptadas al ambiente del hospedero, es considerada una parte esencial dentro de los estudios encaminados a su utilización como agentes de control biológico (Bedding, 1990). El objetivo principal del presente estudio fue investigar si existe presencia de nematodos entomopatógenos en áreas maiceras pertenecientes a la comunidad de Puruagua, municipio de Jerécuaro en el estado de Guanajuato, así como realizar la caracterización morfológica y morfométrica de estos organismos que permita determinar su posición taxonómica, la diversidad de nematodos y su posible asociación con la larva de la gallina ciega *Phyllophaga polyphylla* Bates.

2.1. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2. SELECCIÓN DE ÁREAS DE COLECTA

Se seleccionaron dos predios en la comunidad de Puruagua perteneciente al municipio de Jerécuaro en el estado de Guanajuato donde, de acuerdo con los productores, se ha observado una alta incidencia de “gallina ciega” en cultivos de maíz. El primer predio está localizado a 20° 03′ 47.07″ latitud Norte; 100° 26′ 39.46″ longitud Oeste a una altura de 2055 msnm y el segundo predio a 20° 03′ 59.01″ latitud Norte, 100° 27′ 40.35″ a una altura de 1994 msnm. La distancia entre predio y predio es de 1.82 km.

2.3. COLECTA DE MUESTRAS DE SUELO

En cada localidad, se obtuvieron muestras de suelo de 500g de una profundidad de hasta 15 cm en 25 sitios seleccionados al azar sobre un área de 1 ha. Cada muestra se tomó con una pala recta que fue desinfectada usando etanol al 70% entre cada muestra. Las muestras se colocaron en bolsas de polipapel y se transportaron al laboratorio de Patología de Insectos del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, estado de México, en donde se conservaron a temperatura ambiente hasta su procesamiento.

2.4. PROCEDIMIENTO PARA EL AISLAMIENTO DE NEP (NEMATODOS ENTOMOPATOGENOS)

Los NEPs fueron aislados de muestras de suelo previamente homogeneizadas, utilizando larvas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) como cebos (Bedding y Akhurst, 1975; Zimmerman, 1986). Las muestras de suelo fueron humedecidas con agua destilada estéril y cinco submuestras de 80 g cada una se tomaron de cada sitio de la muestra y se depositaron en vasos estériles de 100ml. Tres larvas de último instar de *G. mellonella*, previamente sumergidas en agua destilada estéril a 56 °C durante 15 segundos, para evitar la formación del capullo, se colocaron en el suelo en cada recipiente y se incubaron a 25 °C en completa oscuridad. Durante los tres primeros días, los recipientes fueron invertidos cada 24 h para inducir el movimiento de las larvas y aumentar la probabilidad de hacer contacto con los nematodos. La infección de las larvas de *G. mellonella* se anotó cada 24 h durante 20 días.

En total se realizaron tres replicas por muestra de suelo y localidad. Las muestras se incubaron a 25 °C por 15 días en oscuridad total. Los cadáveres se recogieron, se esterilizaron externamente sumergiéndolas en etanol al 96% durante 10 segundos y luego se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril, se colocaron en placas de Petri estériles que contenían papel filtro humedecido Whatman N° 1 y se incubaron a 25 °C. Las larvas fueron examinadas cada 24 horas durante diez días para la aparición de nematodos. Una vez detectados los nematodos, las larvas fueron colocadas en trampas blancas (White, 1927; Woodring y Kaya, 1988) para recoger los juveniles infectivos (JI). Los JI se colectaron en vasos de precipitado, se lavaron durante una hora con formalina al 0.1% y

cloruro de benzalconio al 2%. Los JI se dejaron precipitar y concentraron quitando el exceso de estas soluciones y se lavaron con un cambio de agua destilada estéril, se almacenaron en frascos de 200 ml de cultivo de células (Sarstedt ®, Sarstedt México S. de RL de CV, Tlalnepantla, México) que contienen 40 ml de agua destilada estéril y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta que fueran necesarios.

2.5. PROPAGACIÓN, CONSERVACIÓN Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE NEMATODOS

De los muestreos realizados se obtuvieron 2 aislamientos (I-23 y III-16) de nematodos entomopatógenos. Para la propagación y obtención de adultos, de cada uno de los aislados (I-23 y III-16) se inocularon de manera individual 12 larvas de *G. mellonella* con aproximadamente 100 JI en placas de cultivo de tejidos (SARSTED) de 12 cavidades provistas con PEAT MOSS humedecido con 50 ml de agua destilada estéril, las placas fueron incubadas a 25 °C. Al séptimo día 4 larvas de *G. mellonella* fueron disectadas y con la ayuda de un microscopio estereoscópico fueron seleccionados nematodos de primera generación tanto hembras como machos, estos se colocaron dentro de un Siracusa con solución salina al 1%.

La segunda generación de nematodos entomopatógenos se obtuvo al décimo día, para lo que se disectaron 4 larvas con la misma metodología descrita anteriormente. Después de obtenidos, hembras y machos de primera y segunda generación se procedió a la fijación y montaje de especímenes para su caracterización morfológica.

2.6. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

Se utilizaron las técnicas de microscopía de luz y microscopia electrónica de barrido para la obtención de medidas morfométricas de hembras y machos de primera y segunda generación así como de juveniles infectivos.

2.6.1. PREPARACIÓN DE ESPECÍMENES PARA MICROSCOPIA DE LUZ

Los nematodos colectados de larvas infectadas de *G. mellonella* y transferidos a un Siracusa con solución salina al 1%, se colocaron en una plancha eléctrica a 96 °C por 35 segundos. Tras la muerte de los nematodos, con una micropipeta se absorbió el exceso de solución salina, teniendo cuidado de no absorber los nematodos, y se adicionó formol al 4%. En seguida se colocaron en viales de vidrio de 5ml con formol al 4% como fijador. Se dejaron reposar por dos semanas antes de iniciar el proceso de deshidratación.

En cajas Petri de vidrio de 60 x 15mm y sin cerrar por completo se pasaron los nematodos y se colocaron dentro de una cámara de alcohol 96% con la finalidad de hacer el intercambio de formol por alcohol, iniciando el proceso de deshidratación de acuerdo con el método de Seinhorst (1959).

Para iniciar la deshidratación, con la ayuda de una micropipeta y de un microscopio estereoscópico se removió la mayor cantidad posible del fijador (sin succionar los nematodos) y se agregó la solución A (Etanol 96%: 20 partes / Glicerina 100%: 1 parte / Agua destilada: 79 partes). Después de dos a tres días se removió, de la misma manera, la solución A y se agregó la solución B (Etanol 96%: 93 partes / Glicerina 100%: 7 partes)

hasta casi llenar la caja la cual se dejó a temperatura ambiente hasta evaporarse el alcohol. Tras evaporarse 2/3 de la caja con la solución B, se reemplazó el líquido por solución C (Etanol 96%: 80 partes / Glicerina: 20 partes). Al término de la evaporación y no oler a alcohol, la caja Petri se colocó dentro de una estufa a 40°C durante dos días. Las muestras se colocaron en una cámara de deshidratación con CaCl₂ para remover los restos de agua.

Después de permanecer una semana en la cámara de deshidratación, los nematodos se montaron en laminillas de Cobb (Seinhorts, 1959) y se sellaron con anillos de cera. Se tomaron fotografías a las preparaciones en un fotomicroscopio III de Carl Zeiss® conectado a una cámara digital para microscopia Pax Cam. Las imágenes fueron procesadas con el analizador de imágenes Image Tool versión 3.00 (Wilcox *et al.*, 2002).

Las descripciones de machos, hembras y juveniles fueron hechas con base en las características morfométricas usadas comúnmente para la identificación de nematodos (Chitwood y Chitwood 1937; Nguyen y Smart, 1995; Nguyen y Hunt, 2007; Phan *et al.*, 2003; Stock *et al.*, 2001). Especímenes de la primera y segunda generación de machos y hembras, así como del tercer estado juvenil (JI) de cada aislamiento fueron usados para la caracterización morfológica (Nguyen y Smart, 1993; Stock *et al.*, 2001).

2.6.2. PREPARACIÓN DE ESPECÍMENES PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Para el procesamiento y visualización de características morfológicas de nematodos por medio de microscopía electrónica de barrido, los especímenes se depositaron en viales de

vidrio de 20ml y con la ayuda de una micropipeta se absorbió la mayor cantidad de fijador (formol 4%) para enseguida efectuar cinco lavados con solución buffer de cacodilato de sodio al 0.1 M y pH=7.0 cada 15 minutos. Después de los cinco lavados con buffer, se decantó y se agregó 6 mL de buffer a cada vial. En seguida, se agregó gradualmente (gota por gota) 0.4+0.4+0.4+0.3 mL de glutaraldehído 4% cada 15 minutos (equivalente a una hora) y se repitió el procedimiento. En total se agregaron 6 mL de buffer más 3 mL de glutaraldehído 4%. Los viales se colocaron en refrigeración a una temperatura aproximada de 3 °C por 12 horas. Transcurrido este tiempo, se decantó lo más que se pudo (teniendo la precaución de no perder los especímenes), se efectuaron cinco lavados con solución buffer. Posteriormente, se absorbió el buffer y en cada vial se utilizaron cambios seriales de etanol (5, 10, 25, 50, 60 y 70%) durante 30 minutos. Los viales se colocaron bajo las condiciones de refrigeración indicadas anteriormente.

A continuación, se colocaron los viales con los especímenes en un contenedor y con la ayuda del “Aquasonic Ultrasonic Cleaner” se sometieron a agitación durante 3 segundos para remover partículas contaminantes. En seguida se utilizaron cambios seriales de etanol (80, 90 y 100%) durante 20 minutos; el último cambio se repitió dos veces durante 15 minutos. Después se colocaron muestras de nematodos en camaritas hechas con tubos eppendorf de 2mL y papel filtro (Eisenback, 1985), estas se introdujeron en viales de vidrio de 20mL con etanol 100%. Seguido de esto, las camaritas se colocaron en una secadora de punto crítico (Samdri-780A, Tosusimis) por 40 minutos para remover los fluidos lentamente tanto intercelulares como intracelulares de los especímenes previamente fijados y deshidratados (Eisenback, 1991).

Una vez terminado el proceso de secado, los nematodos fueron montados en portaobjetos para microscopía electrónica de barrido con una cinta de carbón adhesiva por ambas caras y adhesivo líquido; con la ayuda de un microscopio estereoscópico y un pequeño trozo de cinta de carbón adhesiva colocado en la punta de unas pinzas, fueron acomodados en varios ángulos para la observación de los diferentes caracteres y se cubrieron con una capa delgada de oro (aproximadamente 20nm). Por último se observaron en el microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM – 6390).

2.6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.6.3.1. DESCRIPCIÓN DEL AISLADO I-23

2.6.3.1.1. MACHOS PRIMERA GENERACIÓN

Longitud del cuerpo $1807.4\mu\text{m}\pm 157.9$ (1605.4-1968.2) (Cuadro 1); forma de J al morir (Fig. 2 H). La cutícula presenta anulaciones, campos laterales a lo largo del cuerpo (Fig. 1 A). Cabeza ligeramente redondeada. Región anterior con seis papilas labiales, cuatro papilas cefálicas y dos anfidios conspicuos. Cavidad oral triangular y en forma de embudo. Longitud del esófago $216.1\mu\text{m}\pm 11.4$ (203.7-230.6) con procorpus cilíndrico y muscular, metacorpus ligeramente adelgazado, poro excretor localizado en la región media del esófago, bulbo basal piriforme, válvula esofágica diferenciada, anillo nervioso localizado en la región anterior del bulbo esofágico, válvula esófago-intestinal presente (Fig. 2 A y B). Presenta doce pares de papilas genitales y una individual, distribuidas de la siguiente forma: seis precloacales, una media ventral precloacal; papilas cloacales, dos pares localizadas

ventralmente y un par lateral; y tres pares de papilas post cloacales (Fig. 1 A). Cola conoide, mucrón presente (Fig. 1 B), fasmidios inconspicuos.

Espículas pareadas de un color amarillo-dorado, curvadas (Fig. 2 C); rango longitud $78.3\mu\text{m} \pm 5.8$ (73.9-88.3) y anchura $13.3\mu\text{m} \pm 0.9$ (11.9-14.5), manubrio (cabeza) redondeado. Lamina moderadamente curvada, con dos costillas internas proyectándose hacia la punta, velum presente sin proyectarse hasta el final de la espícula (Fig. 3 A y B); punta de la espícula tipo romana. Gubernáculo, en forma de cuña en vista lateral; rango longitud $51.9\mu\text{m} \pm 2.1$ (50.4-55.4) y anchura $9.6\mu\text{m} \pm 0.8$ (8.6-10.7) (Fig. 3 D). Extremo anterior corto. Cuneus en forma de aguja (Fig. 3 C).

2.6.3.1.2. MACHOS SEGUNDA GENERACIÓN

La segunda generación de machos es similar a la primera excepto por la longitud del cuerpo [$1282.2\mu\text{m} \pm 84.2$ (1118.1-1372.5)] así como variaciones en el tamaño del esófago [longitud $156.1\mu\text{m} \pm 6.3$ (145.8-163.6)], de las espículas [longitud $67.7\mu\text{m} \pm 4.6$ (58.4-76.5)] y anchura $10.3\mu\text{m} \pm 1.2$ (8.7-11.8) y gubernáculo [longitud $44.3\mu\text{m} \pm 3.8$ (39.1-50.5)] y anchura $8.9\mu\text{m} \pm 0.8$ (7.8-9.9) (Cuadro 2). Además, también al morir conservan la forma de J.

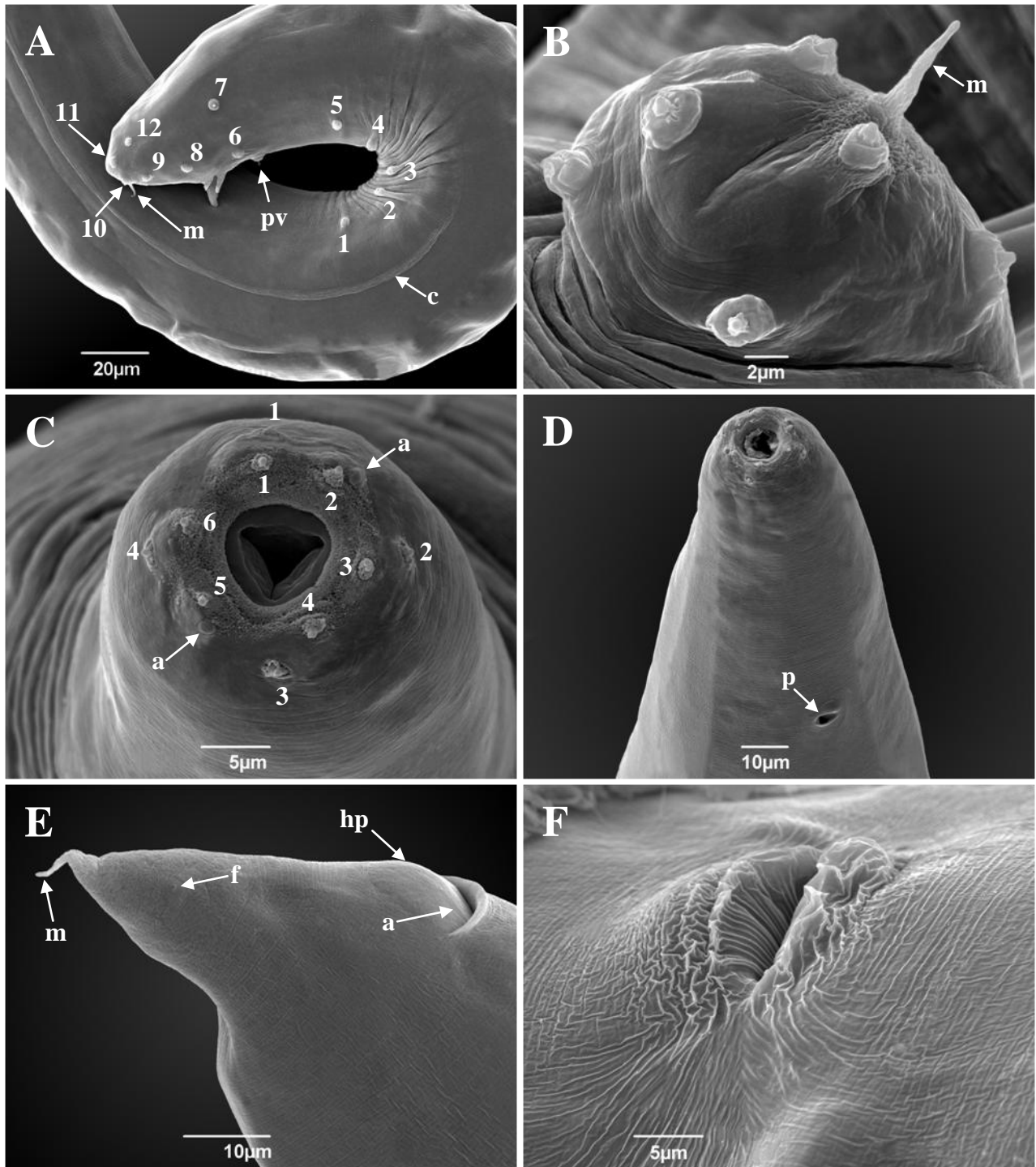


Fig. 1. Microscopía electrónica de barrido primera generación *Steinernema* sp. (I-23). A-B, cola de machos mostrando la distribución de papilas genitales, papila ventral (pv) así como mucrón (m) y campos laterales (c). C, región cefálica mostrando el estoma del macho y la hembra; 6 papilas labiales, 4 cefálicas y 2 anfidios (a). D, región anterior de la hembra mostrando el poro excretor (p). E, región posterior de la hembra mostrando el mucrón (m), fasmidio (f), hinchamiento postanal (hp) y ano (a). F, vulva ubicada en la porción media ventral del cuerpo.

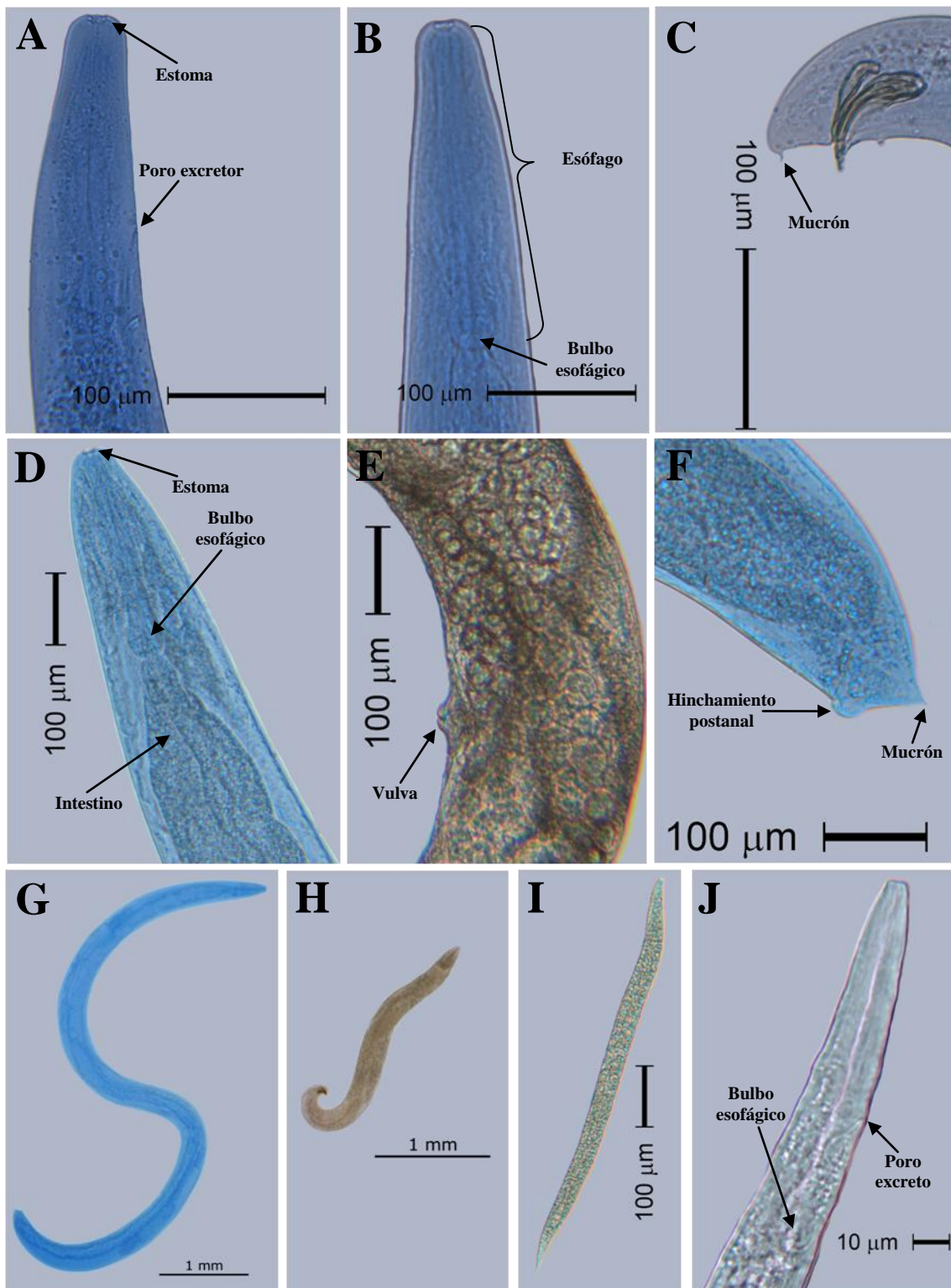


Fig. 2. Microscopía de luz primera generación *Steinernema* sp. montados en lactofenol azul de algodón. A-B región cefálica de machos. C, región posterior con proyección de mucrón. D, región anterior de la hembra. E, vulva conoide. F, hinchamiento post-anal y mucrón. G, hembra primera generación. H, macho con posición en forma de J. I-J, juvenil infectivo, región cefálica proyectándose el bulbo esofágico y el poro excretor.

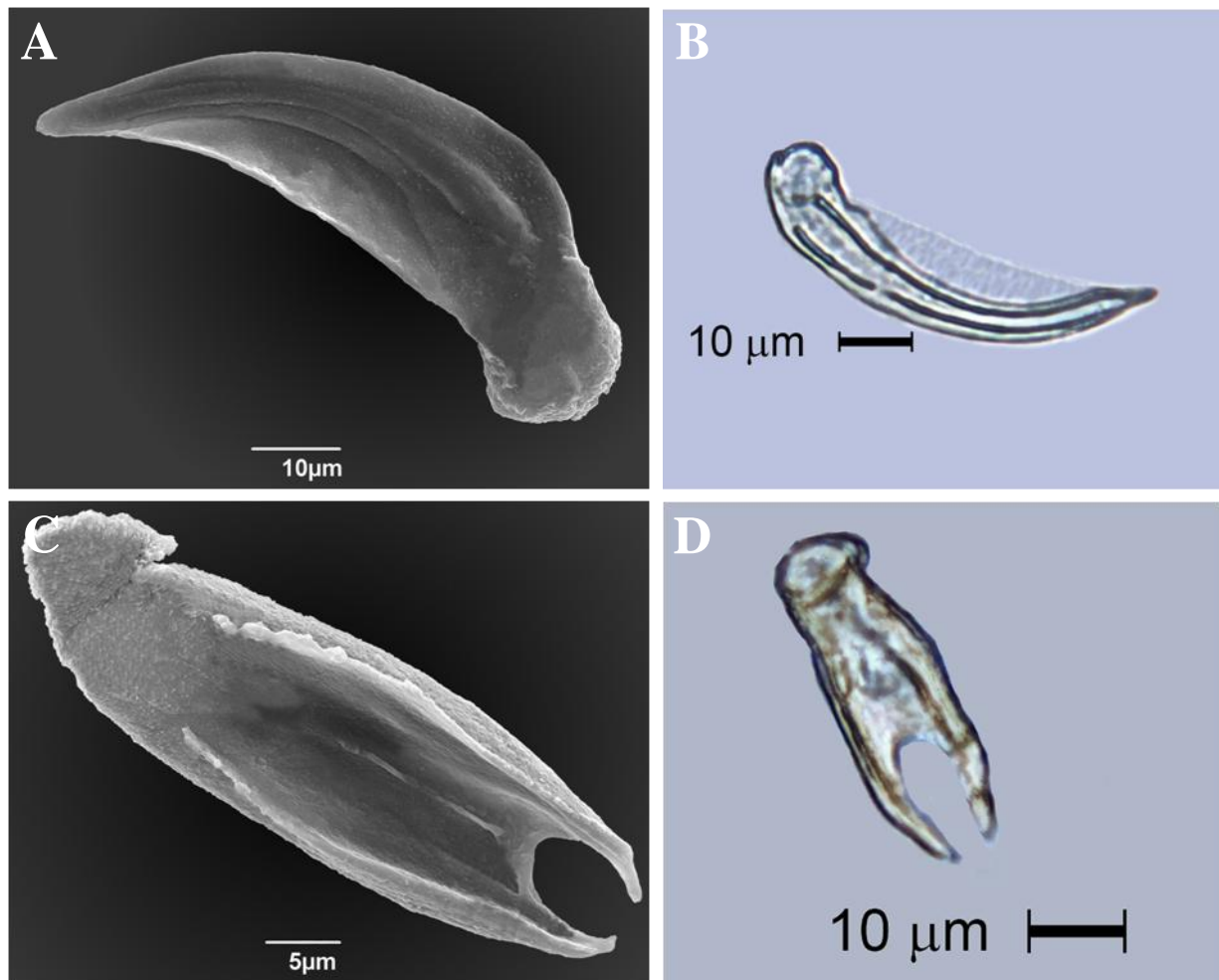


Fig. 3. Microscopía electrónica de barrido y luz, espículas y gubernáculum de primera generación de machos. A-B, espículas terminadas en punta roma y con presencia de velum. C-D, gubernáculum con presencia de cuneus.

2.6.3.1.3. HEMBRAS PRIMERA GENERACIÓN

Similar al macho pero mucho más grande con una longitud total $6499.1\mu\text{m} \pm 351.8$ (6245.1-7108.2) (Cuadro 1). Forma de “S” al morir (Fig. 2 G). La cutícula presenta pequeñas anulaciones. Campos laterales no visibles. Fasmidios poco visibles. Región cefálica redondeada y uniforme. Región anterior con seis papilas labiales, cuatro papilas cefálicas y dos anfidios conspicuos (Fig. 1 C). Estoma triangular y en forma de embudo. Longitud del

esófago $333.2\mu\text{m} \pm 28.1$ (304.9-374.6) con procorpus cilíndrico y muscular, itsmo visible con un marcado adelgazamiento; válvula esófago-intestinal presente; bulbo basal similar a otros esteinernematidos (Fig. 2 D). Anillo nervioso localizado en la región anterior del bulbo basal. Poro excretor (Fig. 1 D) localizado anterior al anillo nervioso. Vulva amplificada (Fig. 1 F y 2 E) con la abertura situada transversalmente. Cola conoide con ámpula postanal y mucrón presente (Fig. 1 E y 2 F).

2.6.3.1.4. HEMBRAS SEGUNDA GENERACIÓN

Excepto por la longitud del cuerpo ($2489.7\mu\text{m} \pm 842.3$ (2288.7-3301.1)) la segunda generación de hembras es similar a la primera. Presentan variaciones en la longitud del esófago [$179.1\mu\text{m} \pm 8.3$ (162.9-189.9)] (Cuadro 2). Además, al morir tiene la forma de arco.

2.6.3.1.5. JUVENIL INFECTIVO

Longitud del cuerpo $724.2\mu\text{m} \pm 47.1$ (609.6-828.2) (Cuadro 1). Al morir presentan formas variadas como en J, arco y recta (Fig. 2 I). El cuerpo es delgado con anulaciones en su cutícula, la parte anterior o cefálica es un poco cuadrada y sin anulaciones; la parte posterior presenta un adelgazamiento terminando en punta (Fig. 4 F). Entre la décima novena y centésima anulación se inician los campos laterales.

Después de dos porciones del tamaño de la cabeza comienzan a aparecer dos líneas formando los primeros dos campos laterales (Fig. 4 C); a la altura del poro excretor se localizan ocho campos (Fig. 4 D); disminuyendo a dos campos laterales a la altura del ano

y fasmidio (Fig. 4 E). La fórmula de los campos laterales corresponden a: 2-8-2. Fasmidio presente localizado ventral al campo lateral cerca de la región media de la cola (Fig. 4 E). Estoma triangular. Presencia de cuatro papilas cefálicas proyectadas y anfidios presentes (Fig. 4 A y B), papilas labiales no visibles. Longitud del esófago $106.5\mu\text{m}\pm 4.3$ (95.8-120.3); faringe con procorpus cilíndrico y muscular amplio, estrechándose a nivel del istmo y con un bulbo basal subpiriforme con una débil válvula esofágica desarrollada. Poro excretor localizado cerca de la región media del esófago (Fig. 2 J). Ano distinto. Longitud de la cola $75.9\mu\text{m}\pm 2.7$ (71.5-81.1). Porción hialina no visible.

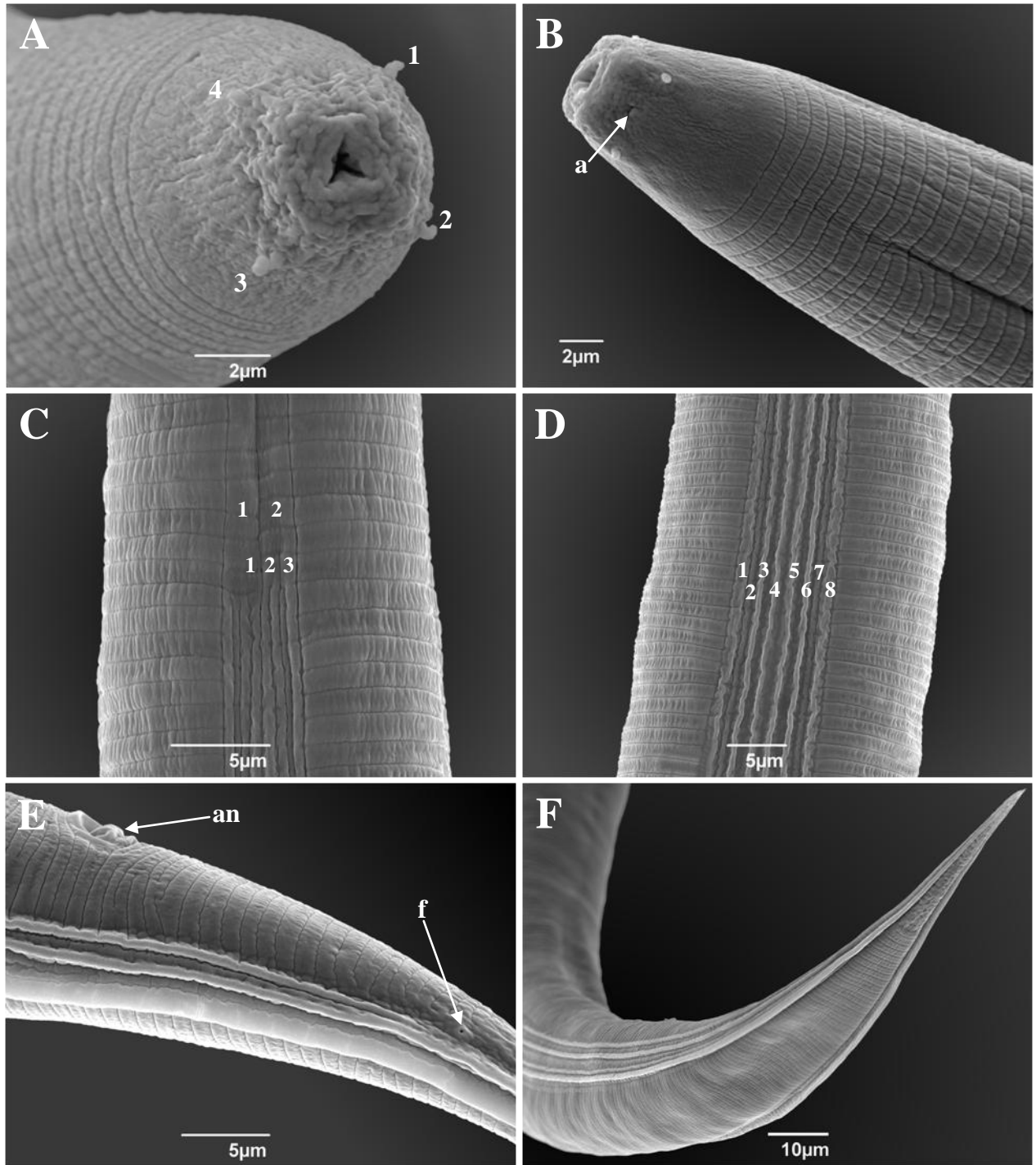


Fig. 4. Microscopía electrónica de barrido juvenil infectivo. A-B, región anterior mostrando la distribución de papilas y anfidios (a). C-E, disposición y división de campos laterales (2, 3, 8, 4, 2), fasmidio (f) localizado después del ano (an). F, terminación de la cola en forma de punta.

2.6.3.2. DESCRIPCIÓN DEL AISLADO III-16

2.6.3.2.1. MACHOS PRIMERA GENERACIÓN

La descripción coincide con las características mencionadas para el aislado I-23. La longitud promedio del cuerpo [$1942.8 \mu\text{m} \pm 490.0$ (1406.6-2523.3)] (TBL) y la distancia región anterior-poro excretor [$120.7 \mu\text{m} \pm 9.1$ (110.8-134.9)] (EP) no mostraron mucha variación, comparados con el aislamiento I-23; así como los valores máximos y mínimos, los cuales se encuentran muy cercanos entre sí. No solo el largo del cuerpo es muy similar, sino también el largo de la cola ($34.5 \mu\text{m} \pm 3.9$) (TL), la longitud de las espículas ($72.3 \mu\text{m} \pm 5.8$) (SpL) y el gubernáculo ($50 \mu\text{m} \pm 3.8$) (GuL) (Cuadro 1).

2.6.3.2.2. MACHOS SEGUNDA GENERACIÓN

Son de menor tamaño comparados con los machos de primera generación, con una longitud promedio $1287.1 \mu\text{m} \pm 117$ (1140.9-1495.8); se observa alta coincidencia con las características y valores dadas para I-23 (Cuadro 2).

2.6.3.2.3 HEMBRAS PRIMERA GENERACIÓN

La descripción del aislado I-23 coincide con todas las características morfológicas de las hembras de primera generación del aislamiento III-16, sin embargo, la longitud mínima y máxima del cuerpo así como la desviación estándar de estos valores, mostró que son ligeramente más largos $7611.9 \mu\text{m} \pm 1549.5$ (5912.1-10029.8); la anchura máxima del

cuerpo [$298.1 \mu\text{m} \pm 32.5$ (254.0-336.6)] (MBW), la distancia región anterior-vulva [$2324.3 \mu\text{m} \pm 640.4$ (1519.2-3124.2)] (MBW), la longitud de la cola [$79.2 \mu\text{m} \pm 7.0$ (71.7-88.5)] (TL) y el diámetro cuerpo-región anal [$140.2 \mu\text{m} \pm 12.6$ (118.6-149.1)] (ABW) también mostraron poca variación (Cuadro 1).

2.6.3.2.4 HEMBRAS SEGUNDA GENERACIÓN

Las hembras presentan características similares a las descritas para el aislado I-23, sin embargo, se observa que el promedio general de la longitud del cuerpo es más corto ($2295.6 \mu\text{m} \pm 413.6$ (1583.8-2675.1) así como la anchura máxima del cuerpo ($142.2 \mu\text{m} \pm 17.9$ (126.6-167.1) (Cuadro 2).

2.6.3.2.5. JUVENIL INFECTIVO

Las características son similares a las dadas para I-23, el promedio de la longitud del cuerpo es $754.8 \mu\text{m} \pm 37.4$ (703.1-860.9). El arreglo de los campos laterales son idénticos al aislado I-23, siendo éstos: 2, 3, 8, 4, 2 (Cuadro 1).

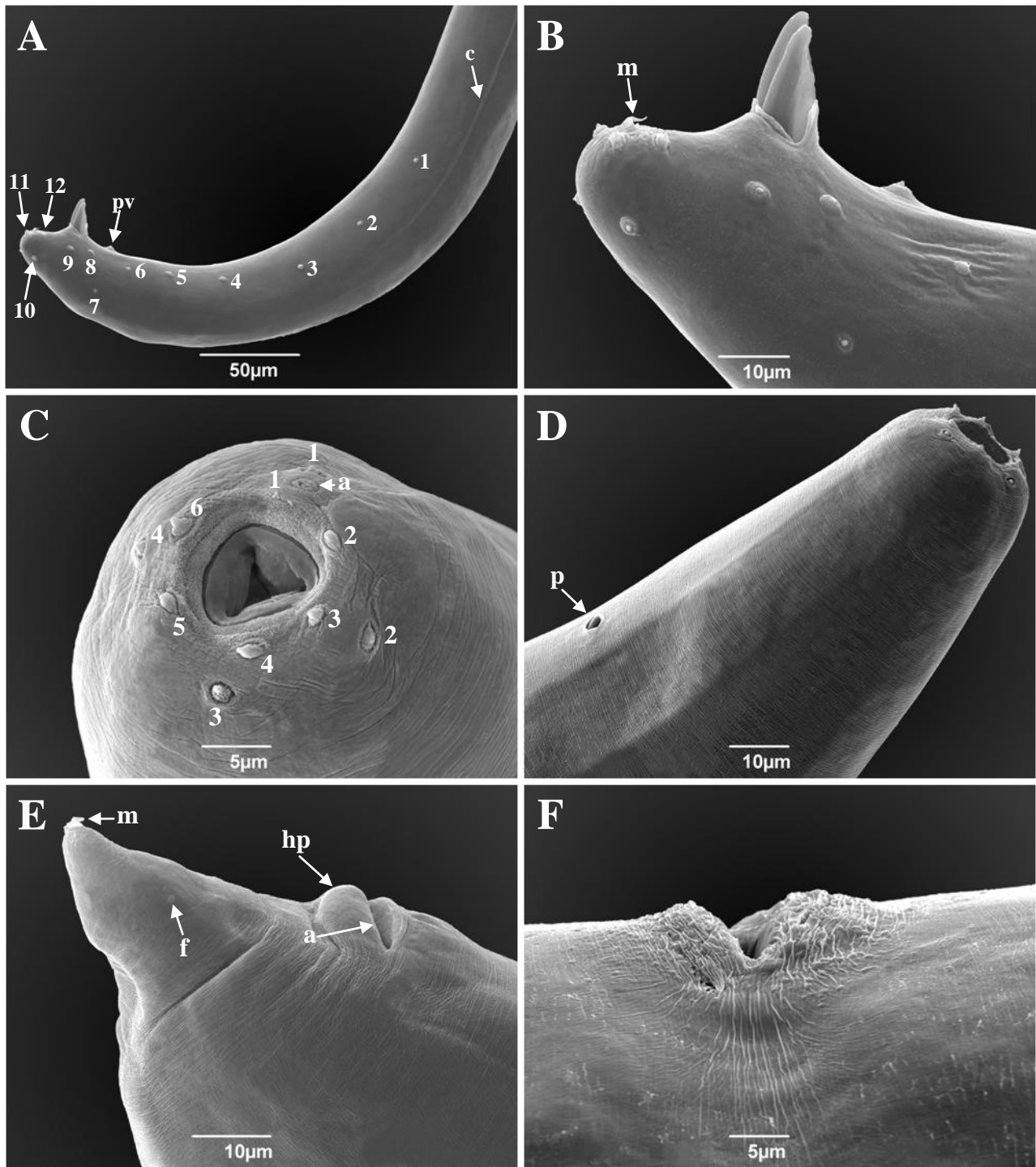


Fig. 5. Primera generación *Steinernema* sp. A-B, cola de machos mostrando la distribución de doce pares de papilas genitales, una papila ventral (pv) así como mucrón (m) y campos laterales (c). C, región cefálica mostrando el estoma del macho y la hembra; 6 papilas labiales, 4 cefálicas y 2 anfidios (a). D, región anterior de la hembra mostrando el poro excretor (p). E, región posterior de la hembra mostrando el mucrón (m), fasmidio (f), hinchamiento postanal (hp) y ano (a). F, vulva ubicada en la porción media ventral del cuerpo.

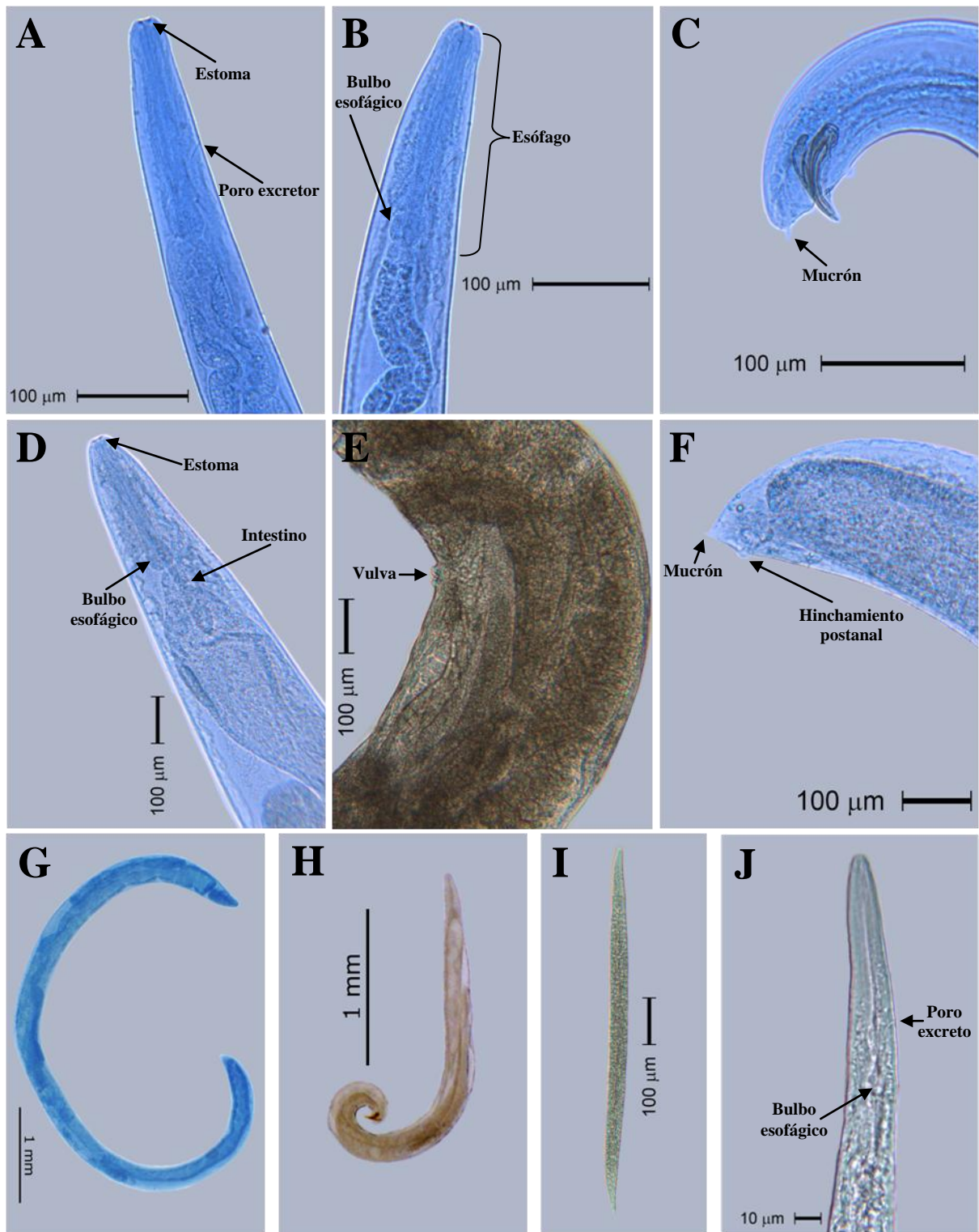


Fig. 6. Primera generación *Steinernema* sp. A-B región cefálica de machos. C, región posterior con proyección de espículas y mucrón. D, región anterior de la hembra. E, vulva conoide. F, hinchamiento post-anal y mucrón. G, hembra primera generación. H, macho primera generación. I, juvenil infectivo. J, región cefálica proyectándose el bulbo esofágico y el poro excretor.

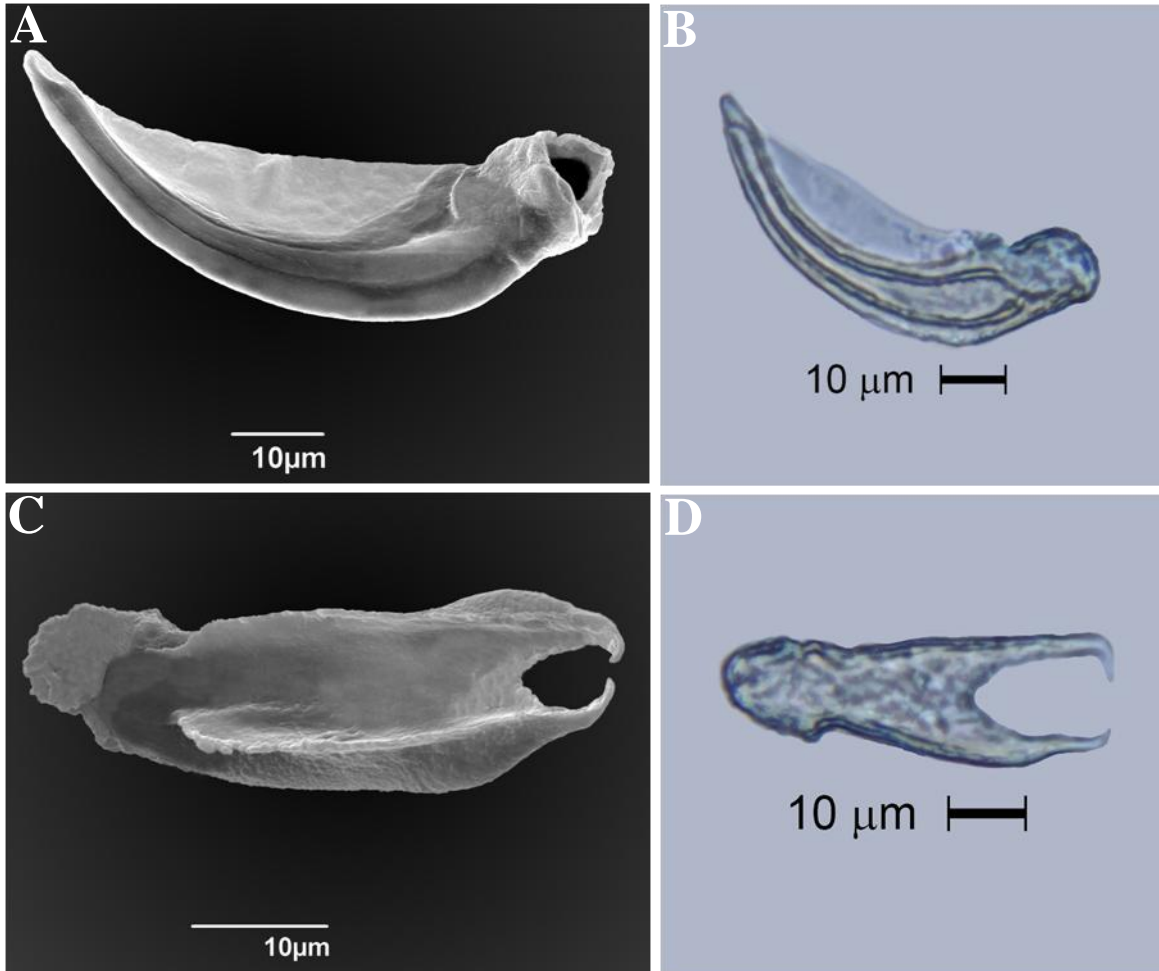


Fig. 7. Espículas y gubernáculum de primera generación de machos. A-B, espículas terminadas en punta roma y con presencia de velum. C-D, gubernáculum.

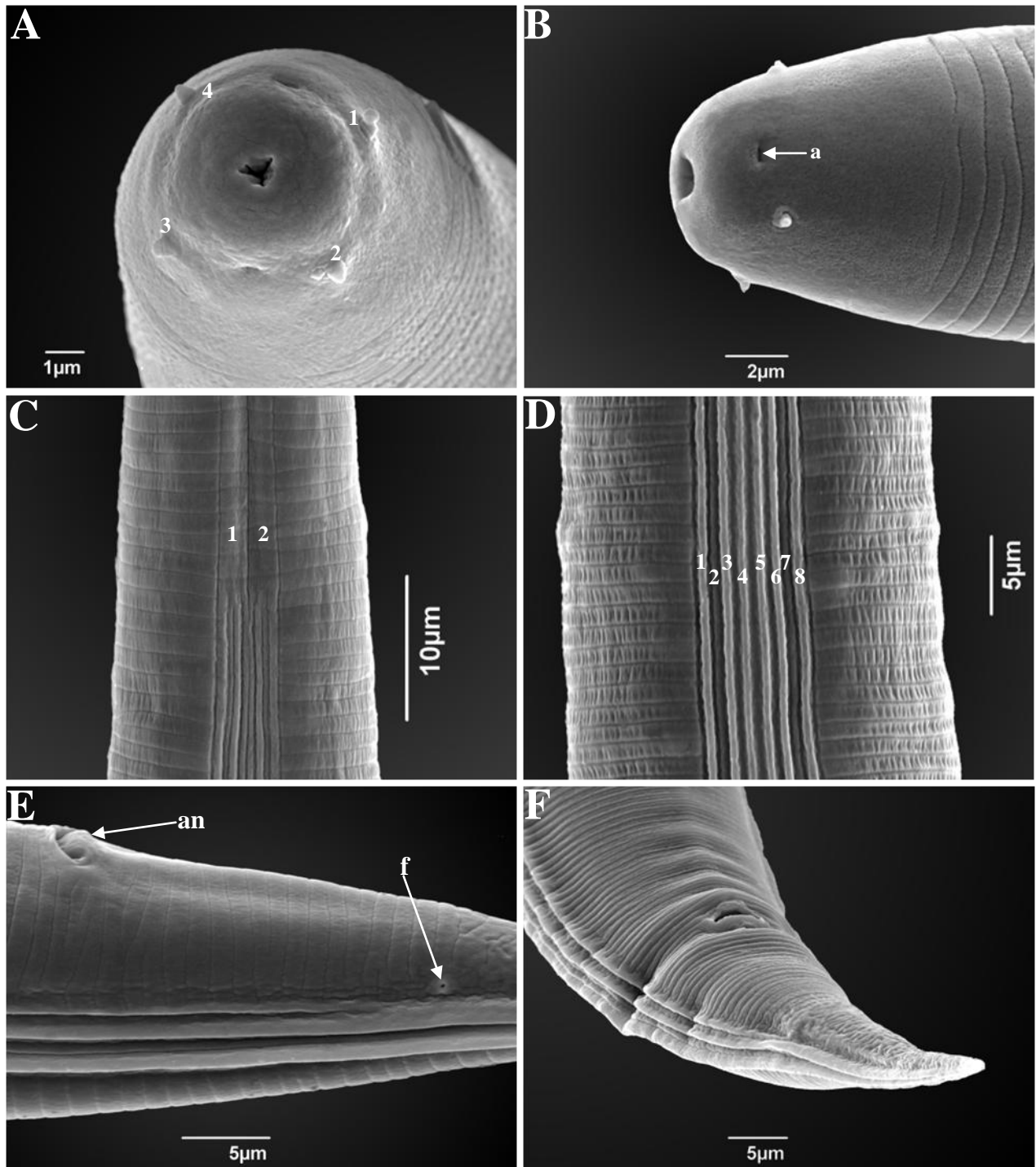


Fig. 8. Juvenil infectivo. A-B, región anterior mostrando la distribución de papilas y anfidios (a). C-E, disposición y división de campos laterales (2, 3, 8, 4, 2), fasmidio (f) localizado después del ano (an). F, terminación de la cola en forma de punta.

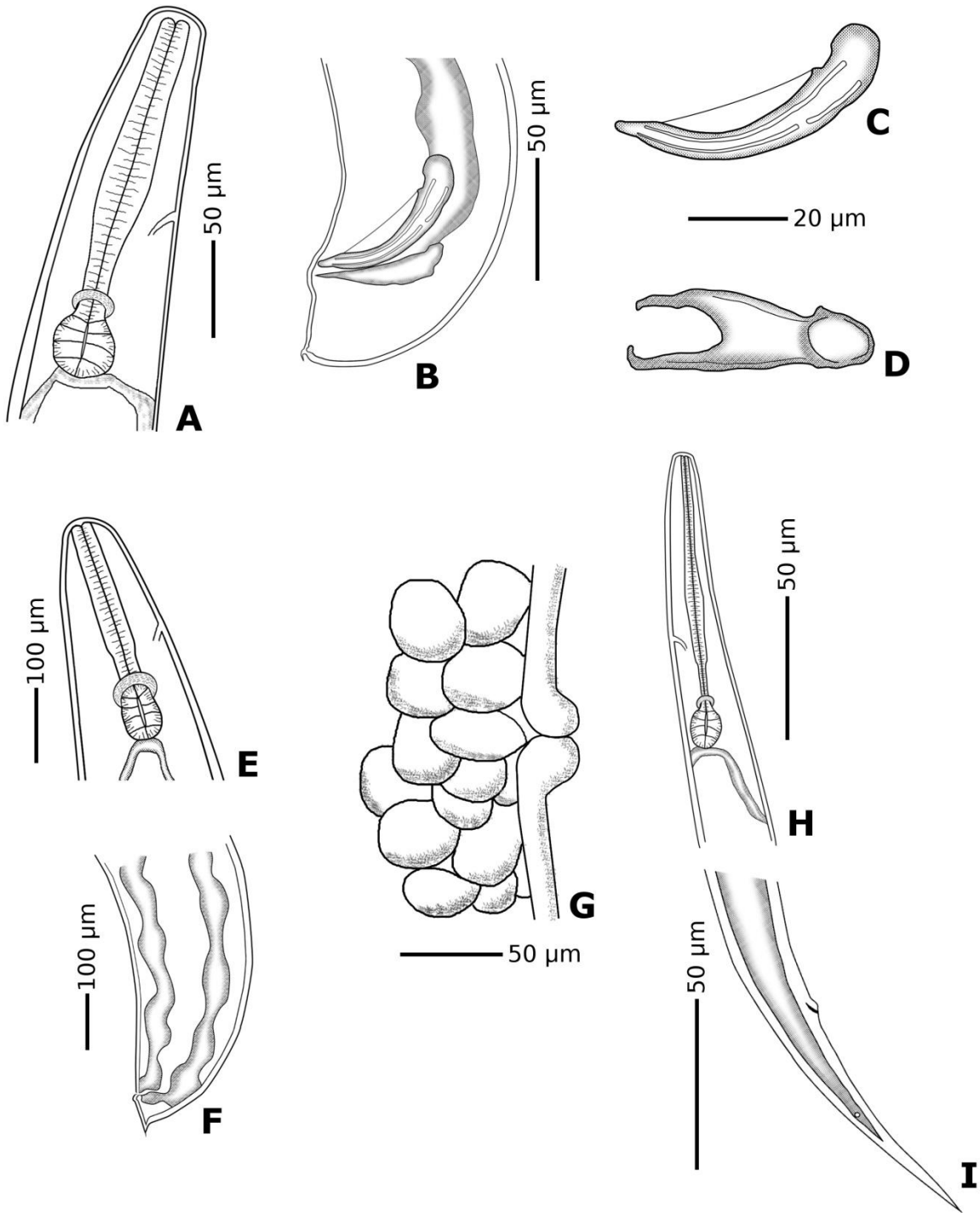


Fig. 9. Dibujos en microscopía de campo claro de *Steinernema* sp. A, parte anterior de machos primera generación. B, parte posterior de machos primera generación con terminación en mucrón. C-E, espícula y gubernáculo. F, parte anterior de hembras primera generación. G, región posterior de las hembras primera generación con terminación en mucrón. H, vulva de la hembra en vista dorsal. I, parte anterior de juvenil infectivo. J, terminación de la cola en punta del juvenil infectivo y presencia de fasmidio.

2.7. LOCALIDAD TIPO

Colecta de especímenes en zonas de pastizales cercanas a los cultivos de maíz en las comunidades de Puruagua y San Lorenzo pertenecientes al municipio de Jerécuaro en el estado de Guanajuato a una altitud de 1994-2055 msnm. El tipo de suelo es arcilloso-arenoso.

2.8. HOSPEDERO TIPO

Desconocido de manera natural. Estos aislamientos se obtuvieron utilizando larvas de último ínstar de *G. mellonella* como cebos introducidos en las muestras de suelo colectadas.

2.9. BIOLOGÍA

Los insectos usados y en los que hubo reproducción fueron larvas del último ínstar de *Galleria mellonella* (L) procedentes de una cría de laboratorio y larvas de tercer estadio de gallina ciega *Phyllophaga polyphylla* Bates, colectadas en el Estado de Guanajuato. Este nematodo se desarrolló bajo condiciones ambientales y de incubación a temperaturas de 20-26 °C. Los juveniles infectivos penetraron el insecto hospedero, en este caso particular se observó que machos y hembras de la primera generación (consideradas como gigantes) aparecieron hasta el séptimo día. Mediante la disección de larvas infectadas de *G. mellonella* se encontró al décimo día la presencia de la segunda generación de adultos. La emergencia de los JI presento variaciones en tiempo.

2.10. ESPECÍMENES TIPO

Cinco holotipos machos de primera generación (I-23, III-16), cinco holotipos hembra de primera generación (I-23, III-16) y cinco holotipos juveniles infectivos (I-23, III-16) depositados en la colección de Entomopatógenos del Laboratorio de Patología de Insectos del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Edo. de México.

2.11. DIAGNOSIS Y RELACIÓN CON OTROS AISLADOS

Los dos aislamientos de *Steinernema* (I-23) y (III-16) mostraron alta similitud morfométrica entre ellos, por lo que se considera que pertenecen a la misma especie. No se presentan variaciones en las espículas así como en la forma del gubernáculo, la fórmula de los campos laterales (2, 3, 8, 4, 2) y presencia de papilas labiales proyectadas en los juveniles infectivos. EP, ES, D% y E% en juveniles infectivos es similar en ambos aislamientos, NR ligeramente mayor en III-16.

Steinernema (I-23) puede ser distinguido de las especies cercanas, *S. ceratophorum* (Jian *et al.*, 1997), *S. bicornutum* (Tallosi *et al.*, 1995), *S. riobrave* (Cabanillas *et al.*, 1994), *S. abbasi* (Elawad *et al.*, 1997) y *S. rarum* (Doucet, 1986) por la longitud del cuerpo del JI [724.2 $\mu\text{m} \pm 47.1$ (609.6-828.2)], la fórmula de los campos laterales, presencia de papilas cefálicas proyectadas y ausencia de cuernos en la región labial. Esta especie puede ser reconocida por la longitud de los machos [1807.4 $\mu\text{m} \pm 157.9$ (1605.4-1968.2)], por la presencia de campos laterales evidentes en machos de primera y segunda generación, presencia de 12 pares de papilas genitales y un mucrón evidente (en ambas generaciones).

Hembras sin epitigma, con un prominente hinchamiento postanal. Además, *Steinernema* (I-23) puede ser distinguida de otras especies relacionadas por las características listadas en los Cuadros 3 y 4.

De acuerdo con las diferencias observadas entre aislamientos, I-23 y III-16 son consideradas como pertenecientes a la misma especie. Dado que existen caracteres morfométricos distintivos, entre el aislamiento I-23 tomada como material tipo, y las especies cercanas, se considera que pertenece a una nueva especie de *Steinernema*.

Cuadro 1. Morfometría de machos y hembras de primera generación y juveniles infectivos de los dos aislamientos de *Steinernema* sp., media ± DS (rango) en µm

Cepa	Machos		Hembras		Juveniles Infectivos	
	I-23	III-16	I-23	III-16	I-23	III-16
Carácter						
n	10	10	10	10	36	36
TBL	1807.4±157.9 (1605.4-1968.2)	1942.8±490.0 (1406.6-2523.3)	6499.1±351.8 (6245.1-7108.2)	7611.9±1549.5 (5912.1-10029.8)	724.2±47.1 (609.6-828.2)	754.8±37.4 (703.1-860.9)
a	16.1 (15.3-15.8)	16.5 (13.6-19.7)	24.0 (24.6-25.2)	25.5 (23.8-29.8)	24.9 (23.7-25.3)	25.8 (26.4-26.7)
b	8.4 (7.9-8.5)	9.3 (7.1-11.1)	19.5 (18.9-20.5)	23.6 (19.6-28.0)	6.8 (6.4-6.9)	6.8 (6.7-7.3)
c	50.5 (46.8-53.3)	56.3 (46.7-62.3)	72.9 (67.9-76.5)	96.1 (82.5-113.3)	9.5 (8.5-10.2)	10.3 (10.7-10.9)
MBW	112.5±7.4 (105.1-124.6)	117.4±12.8 (103.7-128.1)	270.3±16.4 (248.0-288.7)	298.1±32.5 (254.0-336.6)	29.1±2.1 (25.7-32.8)	29.3±2.2 (26.3-32.6)
V			2094.6±152.5 (1891.4-2305.8)	2324.3±640.4 (1519.2-3124.2)		
EP	131.3±17.6 (115.6-154.9)	120.7±9.1 (110.8-134.9)	67.1±1.8 (65.8-68.3)	67.5±0.7 (67.1-68.1)	62.8±2.6 (56.7-66.9)	62.1±1.3 (59.6-64.1)
NR	169.8±4.9 (164.1-176.2)	165.7±3.6 (161.5-169.5)	255.6±35.4 (227.6-305.9)	259.5±15.9 (245.0-277.1)	94.2±4.1 (86.7-102.9)	99.6±4.4 (93.8-110.8)
ES	216.1±11.4 (203.7-230.6)	207.8±11.7 (198.8-226.8)	333.2±28.1 (304.9-374.6)	322.0±21.5 (301.3-357.7)	106.5±4.3 (95.8-120.3)	111.3±3.9 (104.8-118.5)
TL	35.8±1.1 (34.3-36.9)	34.5±3.9 (30.1-40.5)	89.2±8.9 (81.6-104.6)	79.2±7.0 (71.7-88.5)	75.9±2.7 (71.5-81.1)	73.6±3.9 (64.1-80.6)
ABW	68.5±3.8 (63.4-72.8)	72.7±11.2 (61.1-88.5)	152.4±7.8 (142.7-161.3)	140.2±12.6 (118.6-149.1)	18.6±2.7 (14.8-21.9)	17.5±2.4 (13.4-20.9)
SpL	71.9±4.9 (62.2-76.4)	72.3±5.8 (61.6-78.8)				
SpW	13.3±0.9 (11.9-14.5)	14.8±0.7 (13.9-15.6)				
GuL	50.8±4.1 (47.1-55.2)	50.8±3.8 (45.9-55.9)				
GW	9.6±0.8 (8.6-10.7)	10.6±0.7 (9.8-11.5)				
D%=EP/ESx100	60.8 (56.8-67.2)	58.1 (55.7-59.5)	20.1 (18.2-21.6)	20.9 (19.1-22.3)	58.9 (55.6-59.2)	55.8 (54.1-56.9)
E%=EP/TLx100	366.8 (337.0-419.8)	349.9 (333.1-368.1)	75.2 (65.3-80.6)	85.2 (76.9-93.6)	82.7 (79.3-82.5)	84.4 (79.5-92.9)
SW=SpL/ABW	1.05 (1-1.05)	1 (1-0.9)				
GS%=GuL/SpL	0.7 (0.7-0.8)	0.7 (0.7-0.7)				
CCL					2,3,8,4,2	2,3,8,4,2

n= número de individuos medidos; TBL= longitud del cuerpo; a= TBL/MBW; b= TBL/ES; c=TBL/TL; V= distancia región anterior-vulva, MBW= anchura máxima del cuerpo; EP= Distancia región anterior-poro excretor; NR= distancia región anterior-anillo nervioso; ES= longitud del esófago; TL= longitud de la cola; ABW= diámetro cuerpo-región anal; SpL= longitud de la espícula; SpW= Anchura de la espícula; GuL= longitud del Gubernáculo; GW= Anchura lateral del gubernáculo; CCL= número de costillas del campo lateral.

Cuadro 2. Morfometría de machos y hembras de segunda generación de los dos aislamientos de *Steinernema* sp., media \pm DS (rango) en μ m

Cepa/Carácter	Machos		Hembras	
	I-23	III-16	I-23	III-16
n	10	10	10	10
TBL	1282.2 \pm 84.2 (1118.1-1372.5)	1287.1 \pm 117 (1140.9-1495.8)	2489.7 \pm 842.3 (2288.7-3301.1)	2295.6 \pm 413.6 (1583.8-2675.1)
a	16.9 (17.1-17.7)	16.3 (17.3-17.7)	13.6 (15.0-17.1)	16.1 (12.5-16.0)
b	8.2 (7.7-8.4)	7.9 (7.6-8.7)	13.9 (14.0-17.4)	12.5 (9.2-13.9)
c	39.3 (38.2-39.1)	43.8 (40.3-46.2)	34.9 (39.4-41.5)	37.9 (31.5-34.2)
MBW	75.7 \pm 11.9 (63.3-80.1)	78.8 \pm 10.9 (66.1-84.6)	182.5 \pm 41.5 (152.3-193.1)	142.2 \pm 17.9 (126.6-167.1)
V			1399.9 \pm 188.3 (1110.8-1607.5)	1348.3 \pm 133.5 (1131.0-1473.5)
EP	81.56 \pm 2.01 (79.14-83.48)	83.70 \pm 4.81 (77.56-88.63)	52.9 \pm 2.8 (51.5-55.4)	54.7 \pm 2.5 (52.9-56.5)
NR	127.9 \pm 7.5 (115.3-136.5)	133.5 \pm 6.1 (123.4-140.4)	139.9 \pm 9.8 (120.3-156.5)	146.9 \pm 7.5 (138.8-161.5)
ES	156.1 \pm 6.3 (145.8-163.6)	162.5 \pm 8.4 (151.1-172.2)	179.1 \pm 8.3 (162.9-189.9)	183.3 \pm 7.3 (172.1-191.7)
TL	32.6 \pm 2.5 (28.6-35.9)	29.4 \pm 1.2 (28.3-32.4)	71.3 \pm 6.9 (58.1-79.6)	60.6 \pm 10.1 (50.3-78.2)
ABW	53.5 \pm 5.4 (43.6-59.5)	52.9 \pm 3.2 (48.4-58.1)	75.2 \pm 11.1 (54.6-89.8)	71.8 \pm 9.7 (56.2-86.9)
SpL	65.1 \pm 5.4 (55.7-68.8)	64.9 \pm 4.3 (55.9-70.2)		
SpW	10.3 \pm 1.2 (8.7-11.8)	11.5 \pm 0.9 (10.2-12.7)		
GuL	44.3 \pm 3.8 (39.1-50.5)	42.2 \pm 1.1 (40.1-43.2)		
GW	8.9 \pm 0.8 (7.8-9.9)	7.8 \pm 0.9 (6.8-8.9)		
D%=EP/ESx100	52.2 (51.02-54.3)	51.5 (51.3-51.5)	29.5 (29.2-31.6)	29.8 (29.5-30.7)
E%=EP/TLx100	250.2 (232.5-276.7)	284.7 (273.5-274.1)	74.2 (69.6-88.6)	90.3 (72.3-105.2)
SW=SpL/ABW	1.2 (1.2-1.3)	1.2 (1.2-1.2)		
GS%=GuL/SpL	0.7 (0.7-0.7)	0.7 (0.7-0.7)		

n= número de individuos medidos; TBL= longitud del cuerpo; a= TBL/MBW; b= TBL/ES; c=TBL/TL; V= distancia región anterior-vulva, MBW= anchura máxima del cuerpo; EP= Distancia región anterior-poro excretor; NR= distancia región anterior-anillo nervioso; ES= longitud del esófago; TL= longitud de la cola; ABW= diámetro cuerpo-región anal; SpL= longitud de la espícula; SpW= Anchura de la espícula; GuL= longitud del Gubernáculo; GW= Anchura lateral del gubernáculo; CCL= número de costillas del campo lateral.

Cuadro 3. Comparación de la morfometría de machos primera generación y juveniles infectivos de <i>Steinernema (I-23)</i> con otros steinernematidos afines					
Machos					
	TBL	SpL	TL	D%	SW
<i>S. riobrave</i>	1700 ± 9 (1500-19000)	67 ± 4.2 (63-75)	31 ± 1.7 (29-35)	71 ± 8 (60-80)	1.1 ± 0.1 (1.0-1.2)
<i>S. abbasi</i>	1252 ± 189 (999-1534)	65 ± 5.7 (57-74)	26 ± 3 (20-31)	60 ± 5 (51-68)	1.6 ± 0.2 (1.1-1.9)
<i>S. bicornutum</i>	1353 ± 149 (945-1539)	65 ± 4.3 (53-70)	32 ± 2.5 (25-35)	50 ± 3 (50-60)	2.2 ± 0.1 (2.1-2.3)
<i>S. ceratophorum</i>	1385 ± 134 (1136-1694)	71 ± 7 (54-90)	30 ± 4 (23-38)	51 ± 7 (33-69)	1.4 ± 0.2 (1.0-2.0)
<i>S. rarum</i>	1600 ± 1100 (1300-1700)	47.5 ± 3.3 (42-52)	43 ± 4.7 (35-52)	-	-
<i>Steinernema (I-23)</i>	1807.4 ± 157.9 (1605.4-1968.2)	71.9 ± 4.9 (62.2-76.4)	35.8 ± 1.1 (34.3-36.9)	60.8 (56.8-67.2)	1.05 (1-1.05)
Juveniles infectivos					
	TBL	D%	E%	TL	
<i>S. riobrave</i>	622 ± 39.5 (361-701)	49 ± 2 (45-55)	105 ± 5 (93-111)	53.5 ± 3.5 (46.2-58.7)	
<i>S. abbasi</i>	541 ± 24 (496-579)	53 ± 2 (51-58)	86 ± 5 (79-94)	56 ± 3.2 (52-61)	
<i>S. bicornutum</i>	770 ± 52 (648-873)	50 ± 3 (40-60)	80 ± 6 (80-100)	72 ± 5 (63-78)	
<i>S. ceratophorum</i>	706 ± 62 (591-800)	45 ± 3 (40-56)	84 ± 6 (74-96)	66 ± 5 (56-74)	
<i>S. raum</i>	499 ± 30.7 (443-563)	-	-	49 ± 2.8 (43-55)	
<i>Steinernema (I-23)</i>	724.2 ± 47.1 (609.6-828.2)	58.9 (55.6-59.2)	82.7 (79.3-82.5)	75.9 ± 2.7 (71.5-81.1)	

Cuadro 4. Características morfométricas comparativas de juveniles infectivos, machos y hembras de especies afines a *Steinernema* sp.

Especie Carácter	<i>S. riobrave</i> (Texas, USA) Cabanillas <i>et al.</i> , 1994	<i>S. abbasi</i> (Sultanate of Oman, England) Elawad <i>et al.</i> , 1997	<i>S. bicornutum</i> (Vojvodina, Yugoslavia) Tallosi <i>et al.</i> , 1995	<i>S. ceratophorum</i> (Jining, China) Jian <i>et al.</i> , 1997	<i>S. rarum</i> (Córdoba, Argentina) Doucet, 1986	<i>Steinernema</i> . Sp. I-23 (Guanajuato, México)
Carácter único de cada especie	Anchura del cuello del gubernáculo tan ancho como la parte posterior del corpus.	Mucrón ausente en el macho	Mucrón ausente en el macho	Mucrón ausente en el macho	Cuerpo pequeño del Juvenil infectivo y espículas muy curvadas del macho 1 ^a gen.	Mucrón en 1 ^o y 2 ^a gen.
(Juvenil infectivo) Largo del cuerpo	622µm (561-701)	541µm ± 24 (496-579)	730µm ± 52 (648-873)	706µm ± 62 (591-800)	499µm ± 30.7 (443-563)	724.2µm ± 47.1 (609.6-828.2)
Campos laterales	2, 7, 8, 6, 2	2, 6, 8, 7, 6, 2	6	6 a 8	6	2, 3, 8, 4, 2
Cuernos en la región labial de JI	Presentes	Presentes	Presentes	Presentes	Ausentes	Ausentes
Terminación de la cola	Puntiaguda, curvada ventralmente cuando esta relajado	Alargada, dorsalmente curvada, con una depresión ventral en la punta	Conoide, terminación en punta	Conoide, terminación en punta	Conoide, terminación en punta	Conoide, terminación en punta
Fasmidio	Presente	Presente	No indica	No indica	No indica	Presente
(Machos 1^a gen.) Largo del cuerpo	1700µm (1500-1900)	1252µm ± 189 (999-1534)	1300µm ± 150 (900-1005)	1358µm ± 134 (1136-1694)	1600µm ± 1100 (1300-1700)	1807.4µm ± 157.9 (1605.4-1968.2)
Campos laterales	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Presentes
Numero de papilas genitales	24 papilas y 1 independiente	22 papilas y 1 independiente	22 papilas y 1 independiente	22 papilas y 1 independiente	21 papilas	24 papilas y 1 independiente
Con o sin mucrón al final de la cola	Sin mucrón	Sin mucrón	Sin mucrón	Sin mucrón	Con mucrón muy pequeño	Con mucrón
Longitud de las espículas	67µm (63-75)	65µm ± 5.7 (57-74)	48µm ± 3.5 (38-50)	71µm ± 7 (54-90)	47.5µm ± 3.3 (42-52)	71.9µm ± 4.9 (62.2-76.4)
Presencia o ausencia de velum	Con velum	Con velum	Con velum	Con velum	Con velum	Con velum
Longitud del gubernáculo	51µm (47.5-56.2)	45µm ± 4.3 (33-50)	48µm (38-50)	40µm ± 4 (25-45)	35µm ± 7.1 (23-38)	50.8 ± 4.1 (47.1-55.2)
Forma del gubernáculo y cuneus	Canoa y cuneus en forma de Y	Arqueado y cuneus no indica	-	Canoa y cuneus no indica	Arqueado y cuneus no indica	Canoa y cuneus en forma de aguja
(Hembras 1^a gen.) Largo del cuerpo	6500µm (3700-8300)	10730µm (8055-13735)	>10000µm	5300µm ± 1593 (2700-11800)	7390µm ± 1400 (5200-10400)	6499.1µm ± 351.8 (6245.1-7108.2)
Epitigma	Sin epitigma	Con epitigma	No indica	Sin epitigma	Sin epitigma	Sin epitigma
Mucrón al final de la cola	Mucrón muy pequeño	Con mucrón	Con mucrón	Con mucrón	Con mucrón	Con mucrón

2.12. LITERATURA CITADA

Bedding, R. A. and Akhurst, R. J. 1975. A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. *Nematologica* 21: 109±110.

Bedding, R. A. 1990. Logistic and strategies for introducing entomopathogenic nematode technologies into developing countries. 233-246pp. en: Kaya and Gaugler (Ed.) *Entomopathogenic nematodes in biological control*. CRC Press, Boca Raton Fl.

Cabanillas, H. E., G. O. Poinar, and J. R. Raulston. 1994. *Steinernema riobrave* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae) from Texas. *Fundamental and Applied Nematology* 17:123-131.

Chitwood, B. G. and Chitwood, M. B. 1937. *An Introduction to Nematology*. Monumental Printing Company, Baltimore, Maryland, 213 pp.

Doucet, M. M. A. 1986. A new species of *Neoplectana Steiner*, 1929 (Nematoda: Steinernematidae) from Cordoba, Argentina. *Revue de Nematologie*, 9: 317-323.

Eisenback, J. D. 1985. Techniques for preparing nematodes for scanning electron microscopy. In: Barker, K. R., Carter, C. C. & Sasser, J. N. (Eds). *An advanced treatise on Meloidogyne, volume II: Methodology*. A cooperative publication of the Department of Plant Pathology and the United State Agency for International Development, pp. 79-105.

Eisenback, J. D. 1991. Preparation of Nematodes for Scanning Electron Microscopy. Part. 2. of: Methods for collection and preparation of nematodes. In: W.R. Nickle (ed.) *Manual of Agricultural Nematology*. Marcel Dekker New York, p. 87-96.

Elawad, S., W. Ahmad and A. Reid. 1997. *Steinernema abbasi* sp. n. (Nematoda: Steinernematidae) from the Sultanate of Oman. *Fundamental and Applied Nematology* 20:433-442.

Gaugler, R., Kaya, H. K. 1990. *Entomopathogenic nematodes in biological control*. CRC Press, Boca Raton, Fl. 365 pp.

Georgis, R. y R. Gaugler. 1991. Predictability in biological control using entomopathogenic nematodes. *Journal of Economic Entomology*. 84:713-20.

Jian, H., A. P. Reid and D. J. Hunt, 1997. *Steinernema ceratophorum* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae) a new entomopathogenic from north east China. *Systematic Parasitology* 37:115-125.

Nguyen, Khuong, B. y G. C. Smart Jr. 1993. Location of the Phasmids on Infective Juveniles of *Steinernema glaseri*. *Journal of Nematology* 25:4, 625-627.

Nguyen, Khuong, B. y G. C. Smart Jr., 1995. Morphometrics of Infective Juveniles of *Steinernema* spp. and *Heterorhabditis bacteriophora* (Nemata: Rhabditida). *Journal of Nematology* 27:2, 206-212.

Nguyen, K. B., D. J. Hunt and Mráček, Z. 2007. Steinernematidae: species descriptions. 121-609. In: Nguyen, K. B. and D. J. Hunt (Editors.). *Entomopathogenic Nematodes: Systematics, Phylogeny and Bacterial Symbionts*. *Nematology Monographs and Perspectives* 5. Leiden-Boston.

- Phan, L. K., A. S. Subbotin, Nguyen C. N. y M. Moens. 2003. *Heterorhabditis baujardi* sp. n. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Vietnam and morphometric data for *H. indica* populations. *Nematology*, 5:3, 367-382.
- Poinar, G. O. 1990. Taxonomy and Biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. 23-61. En: Kaya and Gaugler (Ed.). *Entomopathogenic nematodes in biological control*. CRC Press, Boca Raton, Fl.
- Seinhorts, J. W. 1959. A rapid method for the transfer of nematodes from fixative to anhydrous glycerin. *Nematologica* 4, 67-69.
- Stock, S. Patricia, Campbell, James, F. y Nadler, Steven, A. 2001. Phylogeny of *Steinernema* Travassos, 1927 (Cephalobina: Steinernematidae) Inferred From Ribosomal DNA Sequences and Morphological Characters. *Journal of Parasitology* 87:4, 877-889.
- Tallosi, B. and R. Ehlers. 1995. *Steinernema bicornutum* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae) from Vojvodina, Yugoslavia. *Russian Journal of Nematology* 3:71-80.
- Wassink, H. y Poinar, G. O. Jr. 1984. Nematological reviews-use of the entomogenous nematode, *Neoplectana carpocapsae* Weiser (Steinernematidae Rhabditida), in Latin America. *Nematropica* 14: 97-110.
- Watschke, T. L., Dernoeden, P.H., and D. J. Shetlar. 1995. *Advances in Turfgrass Science Managing Turfgrass Pests*. Lewis Publ. Ann Arbor, MI. pp. 171-302.
- White, G. F. 1927. A method for obtaining infective nematode from cultures. *Science* 66, 302-303.

Wilcox, D., B. Dove, D. McDavis and D. Greer. 2002. UTHSCSA Image Tool for Windows ver. 3.0. The University of Texas Health Science Center in San Antonio. U.S.A.

Woodring, L. J. and Kaya, H. K. 1988. Steinernematid and Heterorhabditid nematodes: A handbook of biology and techniques. Arkansas Agricultural Experiment Station. Fayetteville, Arkansas, USA. 1–29.

Zimmermann, G. 1986. The Galleria bait method for detection of entomopathogenic fungi in soil. *Journal of Applied Entomology*, 102, 213-215.

CAPÍTULO 3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

A partir del éxito generado con la comercialización y aplicación de los nematodos entomopatógenos como agentes de control biológico, se ha estimulado la investigación y la búsqueda de nuevas especies virulentas (Gaugler y Kaya, 1990; Gaugler, 2002; Uribe-Lorio *et al.*, 2007). La identificación mediante técnicas moleculares es cada día más común ya que se genera información sobre las especies así como la diversidad de estos organismos. Diferentes secuencias de nucleótidos del rDNA como el ITS y D2D3 se han usado para la identificación de especies de nematodos entomopatógenos del género *Steinernema* (Stock *et al.*, 2001; Mráček *et al.*, 2009). Las secuencias del gen ribosomal 28S (LSU), ITS y mitocondrial NADH deshidrogenasa subunidad 4 (ND4), citocromo oxidasa I (*Cox 1*) y el gen mitocondrial ribosomal (16S) han sido utilizados para reconstruir las relaciones filogenéticas entre nematodos entomopatógenos (Adams, 1998; Liu *et al.*, 1999; Adams *et al.* 2006; Nadler *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2009; Clausi *et al.*, 2011). En el presente estudio se utilizaron las regiones ITS y 28S (D2D3) para determinar a nivel de especie, dos aislamientos de nematodos entomopatógenos que fueron obtenidos a través de insectos cebo en zonas de pastizales cercanas a los cultivos de maíz en el Municipio de Purugua, Guanajuato.

3.1. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.1. DETERMINACIÓN MOLECULAR

3.1.1.1. EXTRACCIÓN DE ADN

Aproximadamente 0.02 g de juveniles infectivos liofilizados fueron depositados en tubos Eppendorf estériles. Los tubos fueron colocados en nitrógeno líquido durante cinco minutos, los nematodos congelados fueron molidos usando un micropistilo (Daigger and Company Inc., Vernon Hills. Il, USA) y el AND extraído usando el kit comercial DNeasy® Plant Minikit DNA siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de ADN en las muestras fueron estimadas usando el NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA, USA). La calidad del ADN fue evaluada por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% in buffer TBE 1X (0.089M Tris, 0.089 M boric acid, 0.002 M EDTA; pH 8) teñido con bromuro de etidio (0.1 µg ml⁻¹) y fotografiado.

3.1.1.2. PCR Y SECUENCIACIÓN

La región ITS se amplificó mediante los iniciadores No. 93 (5'-TTGAACCGGGTAAAAGTCG-3') y No. 94 (5'-TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT-3') (Stock *et al.*, 2001). Así mismo, se amplificó la región 28S (D2D3) mediante los iniciadores No. 391, 59 (5'-AGCGGAGGAAAAGAACTAA-3') y No. 501, 59 (5'-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3') (Stock *et al.*, 2001).

Las reacciones de PCR para ambas regiones se realizaron en tubos Eppendorf de 0.2mL en un volumen total de 25 µL. Cada reacción contenía 0.2 µM de cada primer, 150 µM de

cada dNTP (Promega), 0.5 unidades de Taq polimerasa (Promega) en buffer de reacción 1X y 2 µl de ADN (aprox. 20 ng). Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en un termociclador MyCycler (BIO-RAD), donde las condiciones de reacción para ITS1 fueron un ciclo a 94 °C durante 4 minutos, seguidos por 36 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, alineación a 60 °C por 30 segundos y extensión a 72 °C por 50 segundos, con una extensión final a 72 °C durante 7 minutos. Para la región D2/D3 (28S) las condiciones de reacción fueron un ciclo inicial a 94 °C durante 3 minutos, seguidos por 36 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, alineación a 52 °C por 30 segundos y extensión a 72 °C por 1 minuto, con una extensión final a 72 °C durante 7 minutos.

La amplificación en todos los casos se corroboró mediante electroforesis siguiendo el procedimiento de visualización mencionado anteriormente dentro del proceso de extracción de ADN. La limpieza del producto de PCR se realizó con el kit QIAquick PCR Purificación Kit (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante, y las muestras fueron enviadas a la compañía Macrogen Inc. (Geumchen-gu, Seoul, Korea) para su secuenciación.

3.1.1.3. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS

Las secuencias fueron editadas mediante el programa BioEdit (Hall, 1999). El alineamiento múltiple de las secuencias fue realizado con el programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994). Un análisis de Máxima Parsimonia (MP) fue realizado en el programa MEGA v. 5.0 para Windows (Tamura *et al.*, 2011) usando el algoritmo de intercambio del vecino más próximo. La robustez de las ramas fue estimado mediante el método bootstrap con 1000

pseudo-réplicas de los datos (Felsenstein, 1985). El análisis descrito anteriormente se realizó solo para la región D2/D3 ya que las secuencias de la región ITS no tuvieron la calidad necesaria y por lo tanto fueron descartadas. Para el análisis filogenético de las secuencias D2/D3, se recuperaron 21 secuencias de Genbank para usarlas como referencia, dichas secuencias pertenecen a 21 especies descritas del género *Steinernema* (Stock, *et al.* 2001), (Fig. 10).

3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvo un total de ocho secuencias, dos de cada aislamiento de la región ITS, que corresponden a dos aislamientos, donde la longitud de la región ITS1 = 1005 pares de bases (pb) y dos de cada aislamiento de la región 28S (D2D3), que corresponden a dos aislamientos, donde la longitud de la región 28S (D2D3) = 1072 pares de bases (pb).

Las secuencias de la región ITS1 no presentaron calidad de lectura, por el cual no fueron incluidas en el análisis filogenético. Las secuencias de la región D2/D3 de los dos aislamientos fueron depositados en GenBank con los números de acceso KC588386 y KC588387 para los aislamientos I-23 y III-16 respectivamente. De acuerdo con la alineación de las secuencias de la región 28S (D2D3) los aislados I-23 y III-16 presentan un alto nivel de similitud entre ellos y con el género *Steinernema*, sin embargo, los nuevos aislados no se agrupan con ninguna de las especies del género (Fig. 10). Este resultado coincide con el obtenido en el estudio morfométrico, no se encontró similitud con ninguna de las especies cercanas del grupo *bicornutum*; *S. riobrave*, *S. abbasi*, *S. bicornutum*, y *S. ceratophorum* así como *S. rarum* (perteneciente al grupo *carpocapsae*). Sin embargo, se

considera importante examinar la región ITS1, así como otras secuencias mtDNA 16S-COII, ITS1-5.8S-ITS2, 12S y Cox1 (Szalanski *et al.*, 2000; Nguyen *et al.*, 2001; Spiridonov *et al.*, 2004; Clausi *et al.*, 2011) para determinar la especie de ambos aislamientos. De acuerdo con Stock (2002), la descripción morfológica y morfométrica de los nematodos entomopatógenos se ha complicado en los últimos años con el aumento del número de especies descritas, incluso para los taxónomos expertos, a esto, Hunt (2007), menciona que con la taxonomía molecular se ha facilitado en gran medida la descripción de nuevas especies; diversos métodos moleculares han sido desarrollados como herramientas alternativas a la descripción de los NEP (Reid y Hominick, 1992, 1993; Joyce *et al.*, 1994; Grennier *et al.*, 1996; Reid *et al.*, 1997). La combinación de ambas técnicas, morfológica y molecular ofrecen una mayor perspectiva para delimitar especies de NEP representando un mejor trabajo de historia evolutiva (Stock, 2002; Stock *et al.* 2001).

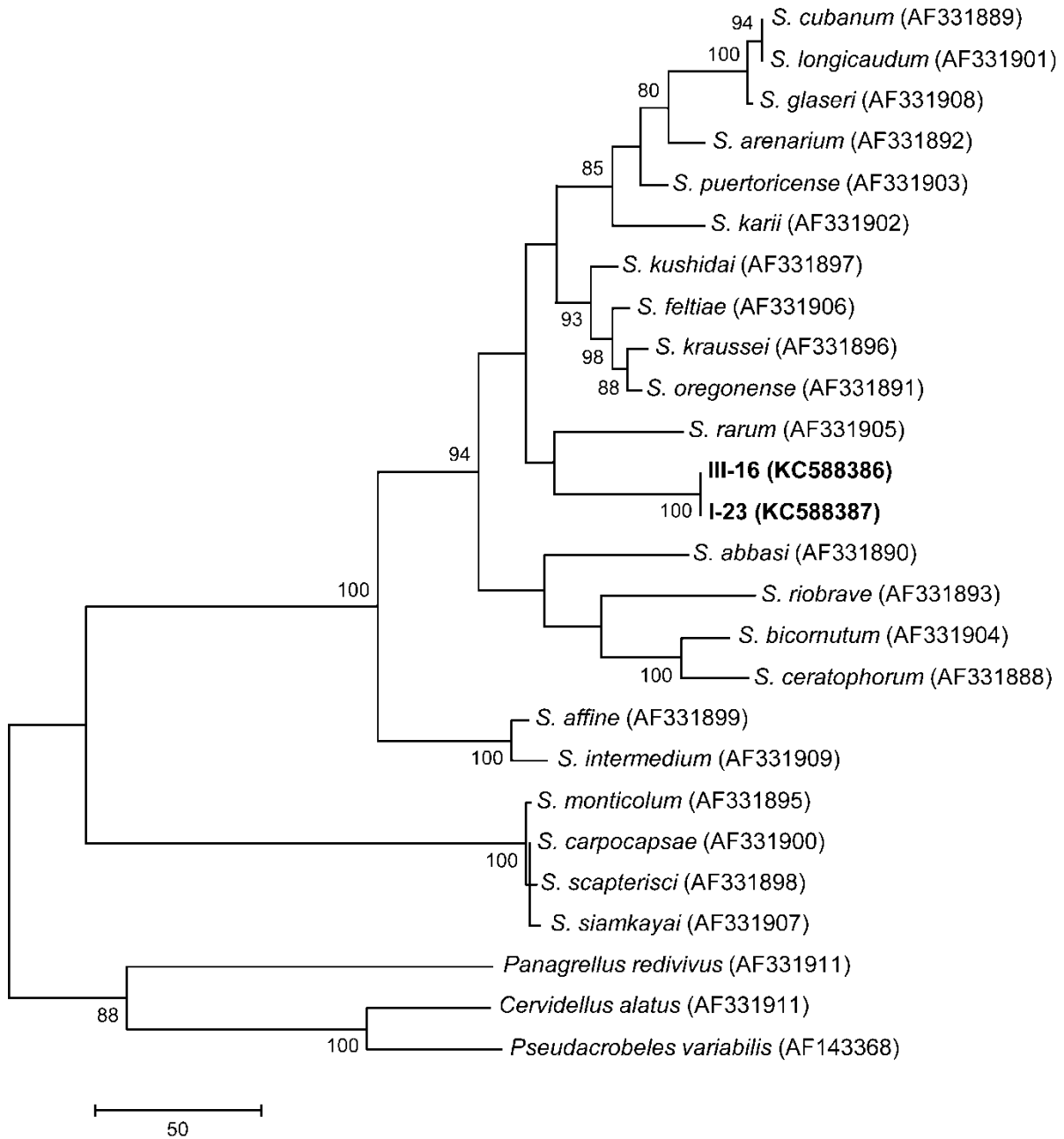


Fig. 10. Filogenia de los aislamientos I-23 y III-16 de *Steinernema* spp. obtenido del análisis de Máxima Parsimonia de la región 28S (D2D3). Los aislamientos obtenidos en este estudio se muestran en negrita. Los números de acceso para GenBank de las especies del género *Steinernema* incluidos para comparación y los obtenidos en este estudio se muestran entre paréntesis. Sólo los valores de arranque por encima del 80% se muestran.

3.3. LITERATURA CITADA

Adams, B. J. 1998. Species concepts and the evolutionary paradigm in modern nematology. *Journal of Nematology* 30: 1-21.

Adams, B. J., A. Fodor, H. S. Koppenhofer., E. Stackebrandt., S. P. Stock, and M. G. Klein. 2006. Biodiversity and systematic of nematode-bacterium entomopathogens. *Biological Control* 37, 32-49.

Clausi, M., A. Longo, G. Rappazzo, E. Tarasco and M. T. Vinciguerra. 2011. *Steinernema vulcanicum* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode species from Sicily (Italy). *Nematology*. Vol. 13:4, 409-423.

Felsenstein, J. 1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 783-791.

Gaugler, R. and Kaya, H. K. 1990. Entomopathogenic nematodes in biological control (pp. 365). Boca Raton, Florida: CRC Press.

Gaugler, R. 2002. Entomopathogenic nematology. CAB International, Wallingford, pp. 357-372.

Grennier, E., Laumond, C. and Abad, P. 1996. Characterization of two species-specific tandemly repeat DNAs from entomopathogenic nematodes *Steinernema* and *Heterorhabditis* (Nematoda: Rhabditida). *Mol. Biochem. Parasitol.* 83: 47-56.

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.

Hunt, D. J. 2007. Introduction. In: Nguyen, K, B, and D. J. Hunt (Eds.). *Entomopathogenic Nematodes: Systematics, Phylogeny and Bacterial Symbionts*. Nematology Monographs and Perspectives Vol. 5: 815 pp.

Joyce, S. A., Reid, A. P., Driver, F. and Currian, J. 1994. Application of polymerase chain reaction (PCR) methods to the identification of entomopathogenic nematodes. In: Burnell, A. M., Ehlers, R.-U. and Masson, J. P. (Eds). *COST 812 Biotechnology: Genetics of entomopathogenic nematode-bacterium complexes. Proceedings of symposium & workshop, St Patrick's College, Maynooth, Co, Kildare, Ireland*. Luxembourg, DGXII, European Commission, pp. 178-187.

Lee MM, M. Sicard, M. Skeie and S. P. Stock. 2009. *Steinernema boemarei* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from southern France. *Systematic Parasitology* 72:2,127-4.

Liu, J.; Berry, R.E. and Blouin, M.S. 1999. Molecular differentiation and phylogeny of entomopathogen nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae) based on ND4 gene sequences of mitochondrial DNA. *J. of Parasitology* 85: 709-715.

Mráček, Z., L. Qi-Zhi and K. B. Nguyen. 2009. *Steinernema xueshanense* n. sp. (Rhabditida, Steinernematidae), a new species of entomopathogenic nematode from the province of Yunnan, southeast Tibetan Mts., China. *Journal Invertebrate Pathology*. 102:1, 69-78.

Nadler, Steven A., E. Bolotin, and S. P. Stock. 2006. Phylogenetic relationships of *Steinernema* Travassos, 1927 (Nematoda: Cephalobina: Steinernematidae) based on nuclear, mitochondrial and morphological data. *Systematic Parasitology*, 63:161–181.

Nguyen, K. B., Maruniak, J. and Adams, B. J. 2001. Diagnostic and Phylogenetic Utility of the rDNA Internal Transcribed Spacer Sequences of *Steinernema*. *Journal of Nematology*. 33(2–3):73–82.

Reid, A. P. and Hominick, W. M. 1992. Restriction fragment length polymorphisms within ribosomal DNA repeat unit of British entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae). *Parasitology*. 105: 317-323.

Reid, A. P. and Hominick, W. H. 1993. Cloning of the rDNA repeat unit from a British entomopathogenic nematode (Steinernematidae) and its potential for species identification. *Parasitology* 107, 529-536.

Reid, A. P., Hominick, W. H. and Briscoe, B. R. 1997. Molecular taxonomy and phylogeny of entomopathogenic nematode species (Rhabditida: Steinernematidae) by RFLP analysis of the ITS region of rDNA repeat unit. *Systematic Parasitology* 37, 187-193.

Spiridonov, S. E., Reid, A. P., Podrucka, K., Subbotin, S. A. and Moens, M. 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*, Vol. 6:4, 547-566.

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

Stock, S. P. 2002. New Trends in Entomopathogenic Nematode Systematics: Impact of Molecular Biology and Phylogenetic Reconstruction. In: Monduzzi (ed.) *Proceedings of the International Conference on Parasitology, Vancouver , Canada.* pp.1-8.

Szalanski, A. L., D. B. Taylor, and P. G. Mullin. 2000. Assessing nuclear and mitochondrial DNA sequence variation within *Steinernema* (Rhabditida: Steinernematidae). *Journal of Nematology* 32:229–233.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* (In Press).

Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673-4680.

Uribe-Lorío, L., Mora, M. and Stock, S. P. 2007. *Steinernema costaricense* n. sp. and *S. puntauvense* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), two new entomopathogenic nematodes from Costa Rica. *Syst Parasitol.* 68: 167-182.

CAPÍTULO 4. EVALUACIÓN DE LA PATOGENICIDAD DE LOS NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS *Steinernema* sp. (I-23 Y III-16) y *Heterorhabditis bacteriophora* (Hb3) SOBRE *Phyllophaga polyphylla* BATES

Los nematodos entomopatógenos (NEP) (Heterorhabditidae y Steinernematidae) asociados en forma mutualista con la bacteria *Photorhabdus* spp. o *Xenorhabdus* spp. han sido desarrollados como bioinsecticidas (Georgis y Manweiler, 1994) y utilizados en programas de control biológico de plagas de insectos (Grewal *et al.*, 2005), principalmente contra plagas del suelo (Koppenhöfer *et al.*, 2008). Comparados con los insecticidas químicos, los NEP presentan la ventaja de no ser tóxicos, son seguros a vertebrados, invertebrados y plantas (Poinar, 1989), además tienen la habilidad de buscar a su hospedero (Ehlers, 2002). La capacidad de penetración, la virulencia, infectividad, y la eficacia del control biológico de los NEP está estrechamente relacionada con la temperatura (Poinar, 1979) entre otros factores abióticos y bióticos, así como con el aislado o especie y la susceptibilidad del insecto hospedero. En el presente estudio se evaluó la patogenicidad de las cepas nativas *Steinernema* (I-23 y III-16) aislados de Guanajuato y *H. bacteriophora* proporcionada por el Dr. H. Kaya, sobre el tercer ínstar de larvas de *P. polyphylla* Bates.

4.1 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.1. NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS

H. bacteriophora y *Steinernema* (I-23 y III-16) fueron propagados en larvas de *G. mellonella* de último ínstar de acuerdo con Woodring y Kaya, (1988), e incubados a 22-26

°C. Los juveniles infectivos (JI) obtenidos en trampas de White (White, 1927) a partir de larvas infectadas de *G. mellonella*, fueron almacenados en agua destilada estéril, en frascos de cultivo de tejidos de 250 ml a temperatura ambiente (22-26 °C).

4.1.2. INSECTOS

Se colectaron larvas de tercer ínstar del género *P. polyphylla* Bates en cultivos de maíz así como de praderas en las comunidades de Puruagua y San Lorenzo, municipio de Jerécuaro (N 20°02'30.1', W 100°28'36.4'') del estado de Guanajuato.

Las larvas colectadas fueron colocadas en contenedores de plástico conteniendo PEAT MOSS (Growing Mix®, Canadá) humedecido y cubiertas con bolsas de plástico para conservar la humedad. Se transportaron al laboratorio de Patología de Insectos para separar a género así como descartar aquellas que presentaran puntos de esclerosamiento o con presencia de ácaros. Las larvas aparentemente sanas, se depositaron de manera individual en vasos de plástico con tapa de 100 gr de capacidad con PEAT MOSS humedecido y dentro de cada vaso se colocó un trozo de zanahoria, desinfectado previamente con cloro al 0.1%, como alimento. Se mantuvieron en el laboratorio de Patología de Insectos a una temperatura ambiente por 30-40 días y cada semana se reemplazó el trozo de zanahoria y se revisó la humedad. Este periodo permitió separar las larvas enfermas o parasitadas, teniendo mayor seguridad de que el material a usar en los bioensayos estuviera sano.

4.1.3. CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE LOS AISLAMIENTOS DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS

Para la caracterización biológica de los aislados de nematodos entomopatógenos, se estimó la relación patogénica de estos sobre larvas de *P. polyphylla* Bates.

4.1.4. PATOGENICIDAD

Este experimento se condujo en el laboratorio de Patología de Insectos a una temperatura de 22-26 °C. Tras permanecer en cuarentena, de manera individual se colocó una larva de gallina ciega en vasos de plástico de 100 mL de capacidad con suelo humedecido (PEAT MOSS) y rodajas de zanahoria como alimento. Después de 24 horas se remplazaron aquellas larvas que permanecieron en la superficie y se efectuaron aplicaciones con una suspensión de 0.5 ml de agua conteniendo 100 juveniles infectivos de *H. bacteriophora* y *Steinernema* (I-23 y III-16). Los testigos recibieron únicamente agua. El experimento se realizó bajo un diseño completamente al azar donde los tratamientos fueron repetidos tres veces en distintos días, con 24 vasos por repetición y se empleó un testigo absoluto utilizando larvas de tercer ínstar de *G. mellonella*. Todo el experimento fue incubado a 22 °C en total oscuridad durante el tiempo que duró el experimento.

La mortalidad de las larvas se evaluó a las 72 horas después del tratamiento y se registró mortalidad cada 24 horas hasta por un lapso de 528 horas (20 días). De manera individual, cada larva se colocó en una caja Petri con papel filtro humedecido bajo las mismas condiciones de temperatura para corroborar presencia de los nematodos. Los datos se

analizaron mediante análisis (Regresión logística) donde se comparó entre repeticiones y posteriormente entre aislamientos con el programa estadístico GenStat versión 8 (Payne *et al.*, 2005).

4.2. RESULTADOS

No hubo diferencias estadísticas entre repeticiones ($F_{2,4} = 0.71$, $P = 0.543$) por lo cual se justifica el haber combinado los resultados de las tres repeticiones para la comparación entre aislamientos. Los niveles de mortalidad fueron significativos entre los tres aislamientos ($f_{2,4} = 67.18$, $P = 0.001$). *H. bacteriophora* fue el que registró mayor porcentaje de patogenicidad (Fig. 10), seguido de *Steinernema* (I-23) (Fig. 11), sin embargo, *Steinernema* (III-16) no registró patogenicidad al igual que el testigo.

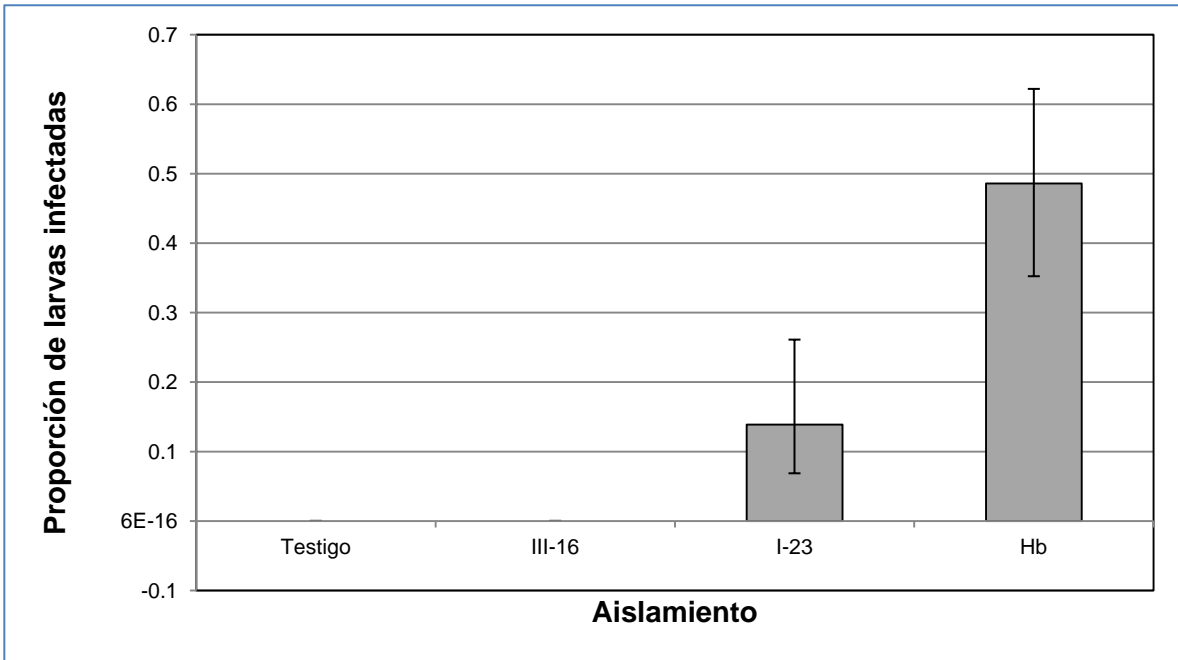


Fig. 11. Proporción de larvas de *P. polyphylla* Bates infectadas por cada uno de los aislamientos (*H. bacteriophora*, *Steinernema* (I-23) y *Steinernema* (III-16)).

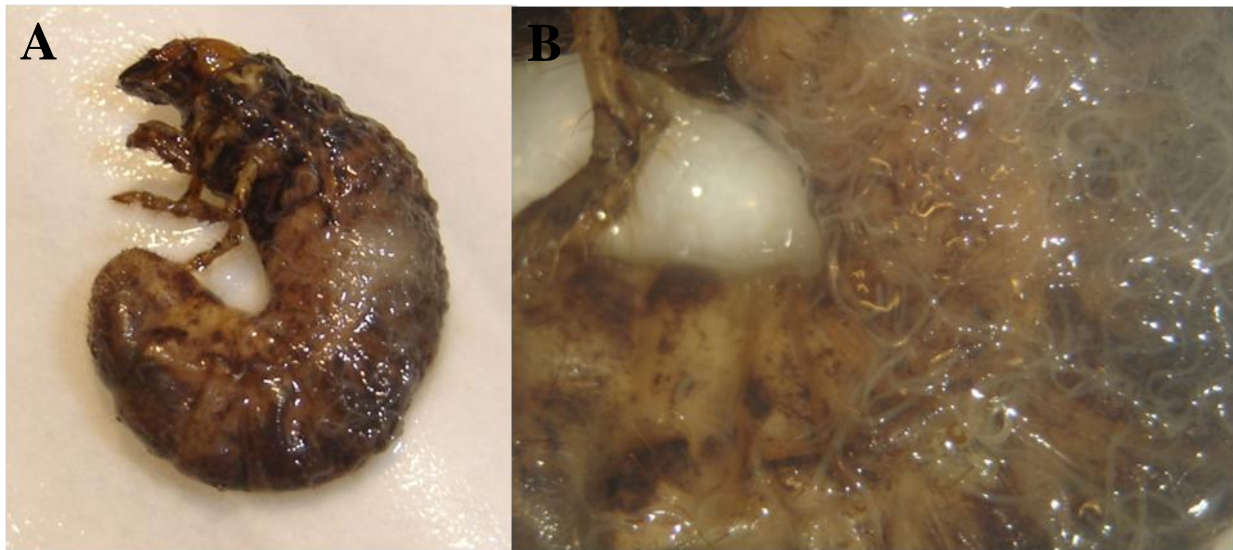


Fig. 12. Infectividad de *Steinernema* (I-23) sobre larvas de tercer ínstar de gallina ciega. A, larva infectada de *P. polyphylla* Bates. B, emergencia de nematodos entomopatógenos.

4.3. DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó la patogenicidad entre los dos nematodos nativos (I-23 y III-16) de *Steinernema* sp. colectados en el estado de Guanajuato y el nematodo exótico *H. bacteriophora* en suspensiones de 0.5 ml de agua conteniendo 100 juveniles infectivos sobre larvas de tercer ínstar de la gallina ciega *P. polyphylla* Bates. Los resultados mostraron una mayor patogenicidad del nematodo exótico *H. bacteriophora* y menor patogenicidad de *Steinernema* (I-23) así como cero patogenicidad de *Steinernema* (III-16), estos resultados coinciden con los obtenidos por Smits, (1992) y Forschler y Gardner, (1992) quienes mencionan que en pruebas de laboratorio las especies del género *Heterorhabditis* presentan mayor patogenicidad que el género *Steinernema* sobre larvas de gallina ciega, en particular *P. hirticula* Knoch.

De acuerdo con Poinar, 1976; Ishibashi y Kongo, 1990; Alatorre, 2010, el género *Heterorhabditis* presenta una gran ventaja morfológica sobre *Steinernema* al poseer un diente dorsal con el que rompe la cutícula del insecto hospedero, facilitando su entrada directa al hemocele. Sin embargo esto no se relaciona totalmente con el potencial que tienen estos nematodos como agentes de control biológico. Koppenhofer y Fuzy, 2007, reportan la presencia de *S. scarabaei* con un alto potencial para invadir y matar a diferentes especies de gallina ciega. La susceptibilidad de la gallina ciega depende del ínstar larval, de la especie de gallina ciega (Quintero-Marin *et al.*, 2006; Koppenhofer *et al.*, 2006), de la especie como del aislamiento utilizado del entomopatógeno (Melo-Molina *et al.*, 2007). Koppenhöfer *et al.* (2008), al evaluar a *H. zealandica* y *H. bacteriophora* así como *S. scarabaei* a una concentración de 2.5×10^9 IJ/ha sobre larvas de segundo y tercer estadio

de *P. georgiana* (Horn) encontraron que *H. zealandica* y *H. bacteriophora* no tuvieron efecto en ninguna etapa larval, en contraste, *S. scarabaei* fue más eficaz contra larvas de tercer estadio que de segundo.

Las condiciones ambientales en que se llevan a cabo los experimentos juegan un papel muy importante. La temperatura juega un papel importante para el buen desempeño de los nematodos entomopatógenos como agentes de control biológico (Poinar, 1979); por lo que se deben evaluar diferentes rangos de temperatura con el fin de optimizar la efectividad de los NEP. Griffin, (1993), menciona que temperaturas de 20-25 °C es la óptima para la actividad del género *Heterorhabditis* y similar a la óptima para la actividad de juveniles infectivos de otros nematodos entomopatógenos.

Koppenhofer *et al.*, (2004), a temperaturas de 22-26 °C y suspensiones de 0.5 ml de agua conteniendo 400 juveniles infectivos, obtuvieron una mayor mortalidad en especies de gallina ciega de tercer ínstar *A. orientalis*, *R. majalis*, *Maladera castanea*, *P. crinita*, *P. congrua* y *P. georgiana* con *S. scarabaei* registrando un 90%. Laznik *et al.*, (2009), reportaron que al evaluar la eficacia de *S. feltiae* “Cepa nativa” y el producto comercial ENTONEM “Ingrediente activo *S. feltiae*” a temperaturas de 20 y 25 °C y en cuatro diferentes concentraciones (0, 250.000 JI/m², 500.000 JI/m² y 1.000.000 JI/m²) sobre *M. melolontha*, la temperatura resultó ser el factor más limitante en la prueba de eficacia de estos agentes biológicos.

4.4. LITERATURA CITADA

Alatorre, R. R. 2010. Nematodos Entomopatógenos, Alternativa en el Manejo de Insectos Plaga. Memoria del XXI Curso Nacional de Control Biológico. Uruapan, Michoacán, México. pp. 139-153.

Ehlers, R. U. 2002. Nematodos entomopatógenos para el control de insectos. *Phytoma España* 144: 77-81.

Forschler, B. T. and Gardner, W. A. 1992. Paritism of *Phyllophaga hirticula* (Coleoptera: Scarabaeidae) by *Heterorhabditis heliothidis* and *Steinernema carpocapsae*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 58, 96-407.

Georgis, R., y S. A. Manweiler. 1994. Entomopathogenic nematodes: A developing biological control technology. *Agricultural Zoology Reviews* 6: 63-94.

Grewal, P. S., Ehlers, R. U, and Shapiro-Ilan, D. I. 2005. Nematodes as Biocontrol Agents, CABI Publishing, CAB International, Wallingford, Oxfordshire, UK, 505pp.

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

Ishibashi, N. and Kondo, E. 1990. Behaviour of infective juveniles. pp 139-153. En Entomopathogenic nematodes in Biological Control. R. Gaugler; H. K. Kaya (Eds.). CRC Press. Boca Raton- Ann Arbor- Boston.

Koppenhofer, A. M., and Fuzy, E. M. 2007. Nematodes for White grub control. Rutgers University. Green Section Record. 27-30 p.

Koppenhofer, A. M., Fuzy, E. M., Crocker, R. L., Gelernter, W. D. and Polavarapu, S. 2004. Pathogenicity of *Heterorhabditis bacteriophora*, *Steinernema glaseri*, and *S. scarabaei* (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae) Against 12 White Group Species (Coleoptera: Scarabaeidae). *Biocontrol Science and Technology*. 14(1): 87-92.

Koppenhöfer, A. M., Grewal, P. S. and Fuzy, E. M. 2006. Virulence of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora*, *Heterorhabditis zealandica*, and *Steinernema scarabaei* against white grub species (Coleoptera: Scarabaeidae) of economic importance in turfgrass in North America. *Biological Control*, 38: 397-404.

Koppenhofer, A. M., Rodríguez-Saona, C. R., Polavarapu, R. and Holdcraft, R. J. 2008. Entomopathogenic nematodes for control of *Phyllophaga georgiana* (Coleoptera: Scarabaeidae) in cranberries. *Biocontrol Science and Technology*. 18(1): 21-31.

Laznik, Ž., Tóth, T., Lakatos, T., Vidrih, M., Trdan, S. 2009. Efficacy of two strains of *Steinernema feltiae* (Filipjev) (Rhabditida: Steinernematidae) against third-stage larvae of common cockchafer (*Melolontha melolontha* [L.], Coleoptera, Scarabaeidae) under laboratory conditions. *Acta Agriculturae Slovenica*. 93: 293-299.

Melo-Molina, E. L., Ortega-Ojeda, C. A. y Gaigl, A. 2007. Efecto de nematodos sobre larvas de *Phyllophaga menetriesi* y *Anomala inconstans* (Coleoptera: Melolonthidae). *Revista Colombiana de Entomología*. 33 (1): 21-26.

Payne, R. W., Murray, D. M., Harding, S. A., Baird, D. B. and Soutar, D. M. 2005. GenStat for Windows (8th Edition) Introduction. VSN International, Hemel Hempstead.

Poinar, G. O. Jr. 1976. Description and biology of a new insect parasitic Rhabditoid, *Heterorhabditis bacteriophora* n. gen., n. sp. (Rhabditida; Heterorhabditidae N. Fam.). Nematologica. Vol. 21. p. 463-470.

Poinar, G. O. Jr. 1979. Nematodes for biological control of Insects. CRC Press, Boca Raton, Florida, U.S.A. 277 pp.

Poinar, G. O. Jr. 1989. Non-insect host for the entomogenous rhabditide nematodes *Neoapectana* (Steinernematidae) and *Heterorhabditis* (Heterorhabditidae). Revue de Nématologie, 12, 423-428.

Quintero-Marín, P., Caicedo, A. M., Montoya-Lerma, J. and Gaigl, A. 2006. Evaluation of three native entomopathogenic nematodes (Rhabditidae) against third instar larvae of *Phyllophaga menetriesi* (Coleoptera: Scarabaeidae). International Journal of Tropical Insect Science. 26: pp 233-238.

Smits, P. H. 1992. Control of white grubs, *Phyllopertha horticola* and *Amphimallon solstitialis* in grass with heterorhabditid nematodes. In T. A. Jackson and T. R. Glare (eds.), Use of Pathogens in Scarab Pest Management. Intercept Ltd., Hampshire, UK. p. 229-236.

White, G. F. 1927. A method for obtaining infective nematode from cultures. Science 66, 302-303.

Woodring, L. J. and Kaya, H. K. 1988. Steinernematid and Heterorhabditid nematodes: A handbook of biology and techniques. Arkansas Agricultural Experiment Station. Fayetteville, Arkansas, USA. pag. 1–29.

5.0. DISCUSIÓN GENERAL

Steinernema (I-23), de acuerdo con el estudio morfológico, es ligeramente parecida a *S. ceratophorum*, *S. bicornutum*, *S. riobrave* y *S. abbasi*, pero puede separarse de estas especies de acuerdo con el estudio filogenético (Fig. 10) y caracteres morfométricos. Los machos de *Steinernema* (I-23) se separan de *S. ceratophorum*, *S. bicornutum*, *S. riobrave* y *S. abbasi* por la presencia de campos laterales evidentes y un mucrón evidente en machos de primera y segunda generación (Fig. 1). El juvenil infectivo de *Steinernema* (I-23) aunque comparte el carácter de papilas cefálicas proyectadas con *S. ceratophorum*, *S. bicornutum*, *S. riobrave* y *S. abbasi* se distingue de estas especies por la longitud del cuerpo, la fórmula de los campos laterales y la ausencia de cuernos en la región labial (Cuadros 1 y 4). La hembra de *Steinernema* (I-23) se distingue de las otras especies por la longitud del cuerpo, ausencia de epitigma y un prominente hinchamiento postanal. Con los resultados morfométricos y el estudio molecular con la región 28S (D2D3), al no agruparse *Steinernema* (I-23) con ninguna de las especies del género, se sugiere que esta pertenece a una nueva especie. Sin embargo, es conveniente del genoma de estos nematodos, tener mayor soporte para separar esta especie de NEP.

Las pruebas de patogenicidad mostraron que el nematodo exótico *H. bacteriophora* ocasionó mayor mortalidad seguido de *Steinernema* (I-23) mientras que *Steinernema* (III-16) no fue virulento. Se recomienda realizar otros ensayos en los que se tome en cuenta la edad de las larvas, las condiciones óptimas de temperatura que favorezcan la invasión y desarrollo de los nematodos.

6.0. CONCLUSIONES

Mediante estudios morfológicos y morfométricos se logró determinar que los dos aislados (I-23 y III-16) colectados en zonas de pastizales cercanas a cultivos de maíz en la comunidad de Puroagua, municipio de Jerécuaro, Guanajuato, México, pertenecen a una misma especie, lo que se corroboró mediante estudios moleculares.

Las especies bajo estudio no fueron ubicadas en ninguno de los grupos del género *Steinernema*. No obstante, la mayor cercanía morfológica y molecular de *Steinernema* sp. (I-23 y III-16) la tuvo con las especies *S. ceratophorum*, *S. bicornutum*, *S. riobrave* y *S. abbasi* pertenecientes al grupo IV (*bicornutum*) donde las características principales de este grupo es la presencia de dos cuernos en la región labial y la presencia de papilas cefálicas proyectadas, características que, a excepción de las papilas cefálicas, permiten separar la especie bajo estudio; la fórmula de los campos laterales es totalmente distinto. *Steinernema* sp. (I-23 y III-16) también se caracteriza por la presencia de campos laterales evidentes en machos de primera y segunda generación, presencia de 12 pares de papilas genitales y un mucrón evidente (en ambas generaciones) que a diferencia de este grupo IV está ausente. Las hembras de *Steinernema* sp. (I-23 y III-16) se diferencian de *S. ceratophorum*, *S. bicornutum*, *S. riobrave* y *S. abbasi* en la longitud del cuerpo.

La evaluación de patogenicidad realizada bajo condiciones de laboratorio sobre *P. polyphylla* Bates mostraron que la cepa exótica *H. bacteriophora* fue la que registró mayor patogenicidad seguido de *Steinernema* (I-23), mientras que *Steinernema* (III-16) no registró infectividad.

Las diferencias en patogenicidad de los (I-23 y III-16), sugiere evaluarlos bajo otras condiciones abióticas, y bióticas, otros instares larvales así como otras especies de gallina ciega como *Anomala* spp. y *Cyclocephala* spp.