



COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS
AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO
POSTGRADO DE FITOSANIDAD
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

**EFFECTO DEL TIPO DE SUELO EN LA
PERSISTENCIA DE NEMATODOS
ENTOMOPATOGENOS Y PATOGENICIDAD
SOBRE EL SALIVAZO DE LA CAÑA DE AZUCAR**

OSCAR PARADA DOMINGUEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2014

La presente tesis titulada **EFFECTO DEL TIPO DE SUELO EN LA PERSISTENCIA DE NEMATODOS ENTOMOPATOGENOS Y PATOGENICIDAD SOBRE EL SALIVAZO DE LA CAÑA DE AZUCAR** realizada por el alumno Oscar Parada Domínguez 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. Raquel Alatorre Rosas

DIRECTOR



Dr. Francisco Hernández Rosas

ASESOR



Dr. Ariel Guzmán Franco

ASESOR



Dra. Luz Irene Rojas Avelizapa

Montecillo, Texcoco, Estado de México, abril de 2014

EFFECTO DEL TIPO DE SUELO EN LA PERSISTENCIA DE NEMATODOS ENTOMOPATOGENOS Y PATOGENICIDAD SOBRE EL SALIVAZO DE LA CAÑA DE AZUCAR

Oscar Parada Domínguez

Colegio de Postgraduados 2014

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar la patogenicidad de los nematodos, *Heterorhabditis sp.* (CPVG13) y *Steinernema spp.* (CPVC12, CPVC13) sobre el salivazo, *Aeneolamia albofasciata* y determinar su persistencia en suelo de tres ingenios azucareros Potrero, Constanica y Motzorongo, en el estado de Veracruz. En el primer experimento la patogenicidad de los nematodos entomopatógenos se evaluó en ninfas de mosca pinta, *Aeneolamia albofasciata* de 3° y 4° instar, se aplicaron 120 JI/ninfa sobre cajas con seis cavidades, cubiertas previamente con papel filtro, cada cavidad contenía un estolón de pasto (*Cynodon sp.*) y una ninfa por cavidad. En el segundo experimento, se evaluó la persistencia de los nematodos entomopatógenos (NEPs) en suelo, el experimento tuvo una duración de 70 días, con evaluaciones semanales independientes, en las cuales se evaluaron 32 unidades experimentales por semana. El experimento de patogenicidad reveló que ambos nematodos fueron capaces de atravesar la saliva que protege a las ninfas, matar y desarrollarse en los cadáveres produciendo nueva progenie de JI. La mortalidad más alta (62.5%) se observó con *Heterorhabditis* (CPVG13), produciendo además la mayor concentración de JI por ninfa (3500JI/ninfa). Se encontraron diferencias significativas entre los perfiles de persistencia entre *Heterorhabditis* (CPVG13) y *Steinernema* (CPVC12). Se encontró un efecto significativo del suelo en la supervivencia de ambos nematodos. El aislamiento que persistió más fue el de *Steinernema sp.*, comparado con el de *Heterorhabditis* (CPVG13). Profundizar en estos estudios, permitirá determinar el impacto de la interacción entre salivazo - NEPs y el suelo.

Palabras clave: control biológico, entomopatógenos, nematodos, salivazo, caña de azúcar.

EFFECT OF SOIL TYPE ON THE PERSISTENCE AND PATHOGENICITY NEMATODE ENTOMOPATHOGENIC SPITTLE BUGS ON SUGAR CANE

Oscar Parada Domínguez

Colegio de Postgraduados 2014

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the pathogenicity of nematodes, *Heterorhabditis* sp (CPVG13) and *Steinernema* spp (CPVC 12 – CPVC13) on the spittlebug *Aeneolamia albofasciata* and determine their persistence in soil from three sugar mills in the state of Veracruz. In the first experiment the pathogenicity of entomopathogenic nematodes on spittlebug nymphs, *A. albofasciata* of 3er and 4th instar was evaluated; 120 IJ were placed on plates with six cavities, each well contained a stolon grass (*Cynodon* sp.) and a nymph. In the second experiment, the persistence of the nematodes was assessed during 70 days, with a weekly sampling of 32 experimental units. The first experiment revealed that both nematodes were able to penetrate the saliva that protects the nymphs killing and developing in the bodies producing new progeny of IJ. The highest mortality (62.5%) was observed with *Heterorhabditis* (CPVG13) which also produced the highest concentration of IJ (3500IJ) per nymph. Significant differences between the profiles of persistence among *Heterorhabditis* and *Steinernema* (CPV12) were found. A significant effect of soil on the survival of both nematodes was found. The isolate which persisted more was *Steinernema* spp. compared to *Heterorhabditis* (CPVG13). A more detailed study on these interactions will help understand the relationship among the nematodes, the spittlebug and soil.

Keywords: biological control, entomopathogenic, nematodes, spittle bugs, sugar cane.

DEDICATORIA

A mi esposa Sarai, por haberme apoyado emocionalmente y durante el desarrollo del experimento, por permanecer siempre a mi lado y ser el amor de mi vida. Dios la bendiga.

A mis padres: Guadalupe Parada Alemán y Rosario Domínguez Zetina por su apoyo y ánimo para continuar preparándome profesionalmente y enseñarme a afrontar los retos con valor y determinación.

A mis hermanos: Ismael, Enrique, Guadalupe, Reyna y Candelaria por el apoyo y motivación durante la investigación, los aprecio por estar ahí siempre que los he necesitado.

A mis suegros: José Chávez e Iracema Mora, por apoyarme cuando necesitaba, y además por permitirme ser parte de su hermosa familia.

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados, institución que me permitió formarme profesionalmente para obtener el grado de maestro en ciencias.

A Dios por darme la oportunidad de prepararme y por las personas maravillosas que permite me rodeen.

A la Dra. Raquel Alatorre por guiarme durante el desarrollo de la investigación, atinados comentarios y por su paciencia con la cual me transmitió los conocimientos. Dios la bendiga.

Al consejo particular de tesis: Dra. Raquel Alatorre Rosas, Dr. Francisco Hernández Rosas, Dr. Ariel Guzmán Franco, Dra. Luz Irene Rojas Avelizapa, por su asesoría muy atinada y por su apoyo.

Al CONACYT, por haberme brindado la beca para el desarrollo de mis estudios de maestría.

Al Dr. Francisco Hernández Rosas por haberme facilitado espacio y apoyado en el laboratorio del Colegio de Posgraduados Campus Córdoba, para la realización de los experimentos y la colecta del material biológico.

ÍNDICE GENERAL

Contenido Pág.

RESUMEN	ii
ABSTRACT	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE DE CUADROS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Ciclo biológico de la mosca pinta	2
1.2 Distribución de la mosca pinta.....	3
1.3 Métodos de manejo del salivazo	3
1.3.1 Manejo químico	3
1.3.2 Manejo cultural	3
1.3.3 Control biológico.....	4
1.3.3.1 Enemigos naturales de la mosca pinta.....	4
1.3.3.2 Hongos entomopatógenos- <i>Metarhizium anisopliae</i>	5
1.4 Nematodos entomopatógenos	5
1.4.1 Importancia de los nematodos entomopatógenos <i>Heterorhabditis</i> <i>sp.</i> y <i>Steinernema sp.</i>	6
1.4.2 Interacción de los NEPs con su hospedero	6
1.4.3 Ciclo de vida de los nematodos entomopatógenos	7
1.4.4 Nematodos entomopatógenos en el control de la mosca pinta	7
1.4.5 Factores bióticos y abióticos relacionados con la presencia de nematodos entomopatógenos	8
1.4.5.1 pH en el suelo.....	8
1.4.5.2 Temperatura del suelo	9
1.4.5.3 Humedad	9
1.4.5.4 Radiación solar	10
1.4.5.5 Textura	10

1.4.5.6 Conductibilidad eléctrica.....	11
1.4. 5.7 Diversidad biológica de microorganismos en la rizósfera ...	11
1.4.5.8 Factores bióticos relacionados con la persistencia de nematodos.....	12
1.5. Componentes microbianos del suelo	12
1.5.1 Hongos	12
1.5.2 Bacterias	13
1.5.3 Actinomicetos	13
1.6 Justificación.....	14
1.7 Objetivo General	15
1.7.1 Objetivo particulares	15
2. MATERIALES Y METODOS	16
2.1SELECCIÓN DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS CONTRA NINFAS DE <i>Aeneolamia albofasciata</i>	16
2.1.1 Propagación de nematodos	16
2.1.2. Colecta y selección de ninfas del salivazo	17
2.1.3. Bioensayo	17
2.1.4 Capacidad reproductiva de los NEPs	18
2.2 CARACTERIZACIÓN DE SUELOS PROCEDENTES DE POTRERO, MOTZORONGO Y CONSTANCIA, INGENIOS AZUCAREROS DEL ESTADO DE VERACRUZ	19
2.2.1 Incidencia de NEPs nativos	20
2.2.2 Características físico- químicas del suelo.....	21
2.2.3 Determinación de poblaciones microbianas cultivables presentes en los suelos procedentes de ingenios azucareros.....	21
2.3 EFECTO DEL TIPO DE SUELO EN LA PERSISTENCIA DE NEMATODOS ENTOMOPATOGENOS EN CONDICIONES CONTROLADAS	
2.3.1 Suelo, nematodos, insectos	22
2.3.2 Preparación de suspensiones a aplicar.....	23
2.3.3 Unidad experimental.....	23

2.3.4	Diseño experimental	23
2.3.5	Análisis estadístico	24
3.	RESULTADOS	25
3.1.	PRUEBAS DE SELECCIÓN DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS CONTRA NINFAS DE SALIVAZO, <i>Aeneolamia albofasciata</i>	25
3.1.3.	Mortalidad de <i>Aeneolamia albofasciata</i>	27
3.1.2	Capacidad reproductiva de JI (juveniles infectivos)	27
3.1.4	Mortalidad ocasionada por otras causas	28
3.2	MEDICIÓN DE LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA DE SUELOS PROCEDENTES DE INGENIOS AZUCAREROS DEL ESTADO DE VERACRUZ; POTRERO, MOTZORONGO Y CONSTANCIA	29
3.2.1	Características físico-químicas del suelo	29
3.2.2.	Microorganismos cultivables - colonias de Bacterias, Hongos y Actinomicetos	31
3.2.3	Incidencia natural de Nematodos entomopatógenos	33
3.3	EFFECTO DEL TIPO DE SUELO EN LA PERSISTENCIA DE NEMATODOS ENTOMOPATOGENOS <i>Heterorhabditis</i> (CPVG13) y <i>Steinernema</i> (CPVG12)	33
4.	DISCUSIÓN GENERAL	36
5.	CONCLUSIONES GENERALES	39
6.	RECOMENDACIONES	40
7.	LITERATURA CITADA	41
	ANEXO 1	52

INDICE DE CUADROS

Contenido	Pág.
Cuadro 1. Nematodos utilizados en la prueba de patogenicidad.	16
Cuadro 2. Diseño experimental para la prueba de patogenicidad de ninfas.....	18
Cuadro 3. Diseño experimental desarrollado durante el ensayo: diversidad biológica... ..	21
Cuadro 4. Numero de nematodos obtenidos a partir de cada ninfa infectada, en suelo proveniente de los ingenios, Constanca, Motzorongo y Potrero.. ..	28
Cuadro 5. Características físico-químicas del suelo de tres ingenios azucareros.... ..	30
Cuadro 6. Sitios trampeados y microorganismos encontrados sobre <i>G. mellonella</i>	33
Cuadro 7. Análisis estadístico, bioensayo persistencia de nematodos entomopatógenos.....	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Contenido	Pág.
Figura 1. Diagrama de muestreo semanal (70 días de evaluación) de la mortalidad de <i>G. mellonella</i> expuestas a los NEPs en suelo.....	24
Figura 2. Ninfas de mosca pinta. a) Ninfa libre de parasitismo. b) Ninfa infectada por <i>Heterorhabditis</i> (CPVG13)c) Ninfa infectada por <i>Steinernema</i> (CPVC12).....	26
Figura 3. Disecciones realizadas a ninfas parasitadas. a) Nematodos adultos de <i>Heterorhabditis</i> (CPVG13)b) Nematodos Adultos de <i>Steinernema</i> (CPVC12)	26
Figura 4. Proporción de mortalidad de ninfas por tratamiento (aislamiento de nematodos) en dosis única de (120 JI) por ninfa.....	27
Figura 5. Parasitismo natural de ninfas de mosca pinta. a) Nematodos mermitidos b) Necrosis de ninfas- posible presencia de bacterias.	28
Figura 6. Colonias aisladas de suelos de ingenios azucareros. A) sitio 1 Potrero. B) sitio 2 Potrero c) Sitio 1 Ingenio Constancia d) Sitio1 Ingenio Motzorongo.....	31
Figura 7. Unidades formadoras de colonias, a) bacterianas, b) hongos y c) actinomicetos, obtenidas a partir de suelo proveniente de tres ingenios azucareros de Veracruz.....	32

Figura 8. Proporciones de mortalidad obtenidas con *Heterorhabditis* (CPVG 13) en larvas de *Galleria mellonella*. Las barras de error representan límites de confianza del 95%, transformada a partir de la escala logística. 35

Figura 9. Proporciones de mortalidad obtenidas con *Steinernema* sp. (CPVC12) en larvas de *Galleria mellonella*. Las barras de error representan límites de confianza del 95%, transformada a partir de la escala logística. La persistencia de J1 constituye el valor promedio de larvas muertas de *G. mellonella* por fecha de evaluación a 25°C..... 35

1. INTRODUCCIÓN

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) es una gramínea tropical de gran importancia en la industria azucarera. México es el séptimo productor a nivel mundial con 49 735, 273 Ton (FAOSTAT, 2011). Entre los estados productores de caña de azúcar destacan Veracruz, Jalisco, Oaxaca, San Luis Potosí y Tamaulipas. La producción nacional anual en el 2012 de acuerdo con el servicio de información agroalimentaria y pesquera fue de 50 946,483.13 Ton. Siendo Veracruz el estado con mayor producción para ese mismo año (18 111,885.63 ton) (SIAP, 2012).

El cultivo de caña se ve afectado por diversos problemas fitosanitarios, destacando la mosca pinta (Homóptera: Cercopidae) o también conocido como salivazo. Comprende 11 géneros y aproximadamente 360 especies de cercópidos registrados en el neotrópico, de los cuales entre 20 - 30 son plagas de gramíneas; los géneros principales son *Aeneolamia*, *Deois*, *Mahanarva*, *Prosapia* y *Zulia* (Peck, 2001; Flores 1994). Gómez (2007), Alatorre *et al*, 2013, mencionan que *Aeneolamia albofasciata* (Lallemand), *Prosapia simulans* (Walker) y *Aeneolamia contigua* son los géneros y especies mayormente distribuidos en México sobre caña de azúcar y en pastos.

Las ninfas se alimentan en las raíces superficiales y en la base del tallo de la caña de azúcar succionando la savia e inyectando toxinas, cuando la infestación es severa causan estrés hídrico, retrasando el crecimiento de la planta restringiendo el paso de nutrientes a las partes aéreas y por lo tanto reduciendo la producción de biomasa (Rodríguez, 1979; Byers y Wells, 1966; Dinardo-Miranda *et al.*, 2000; Valério *et al.*, 2001). Los salivazos en estado adulto generan daños al succionar la savia de las hojas, el daño empieza a desarrollarse donde el insecto realiza la punción para alimentarse, debido a que inoculan una toxina de acción sistémica, la oxidasa diastásica, la cual impide el transporte de nutrientes y la respiración (Enkerlin y Morales, 1979: Gómez 2007), disminuyendo con ello la actividad fotosintética, conduciendo a un desecamiento total (Valerio, 1988). La caña de

azúcar infestada con este insecto reduce los niveles de sucrosa (Mendonça *et al.*, 1996).

En Venezuela se han registrado pérdidas hasta del 25% en producción debido a la especie *A. varia* (Salazar y Proaño, 1989), y en Brasil las pérdidas agrícolas e industriales causadas por la especie *Mahanarva fimbriolata* (Stål) han ascendido a un 60% en la Región Centro-Sur (Mendoza, 2001; Dinardo - Miranda *et al.*, 2006). En México *A. albofasciata* (Lallemand) ha causado pérdidas hasta de 9 ton/ha de caña de azúcar (De la Cruz-Llanas *et al.*, 2005).

1.1 Ciclo biológico de la mosca pinta

El ciclo biológico de la mosca pinta consta de tres fases, huevo, ninfa (N1, N2, N3, N4, y N5) y adulto. El número de huevos que una hembra puede ovipositar varía entre 22 a 300; los huevos pueden ser diapaúsicos, de estivación o invernantes (de noviembre a mayo) y huevos no diapaúsicos (mayo o junio con las primeras lluvias hasta finales de octubre y noviembre) (Bodegas, 1973; Rodríguez *et al.*, 2003; Castillo, 2006). Lo anterior determina el número de generaciones presentes en determinada región geográfica. De acuerdo a un estudio realizado por Rodríguez, *et al.*, 2003, los huevos de *P. simulans* tardan 18 días en eclosionar, la fase de ninfa tiene una duración de 45.5 días y la vida de los adultos es de 16.5 días; cumpliendo un ciclo completo en 71 días.

En relación a lo anterior, *P. simulans* tiene una larga duración del estado de ninfa, comparado con *Aeneolamia reducta* que tienen una duración de 26.1 días y *Aeneolamia lepidior* de 35 días (Peck *et al.*, 2003), esto significa que es una plaga importante debido a la alimentación prolongada en el estado de ninfa, la duración del ciclo está relacionada con el género y especie de mosca pinta y puede tener repercusiones en la disminución de los rendimientos de la caña de azúcar.

Las primeras ninfas aparecen pocos días después del inicio de las lluvias y se prolongan durante todo el periodo lluvioso, apareciendo picos poblacionales de ninfas y adultos de manera escalonada y superpuestas. Las ninfas recién eclosionadas absorben la savia e inician con la producción de saliva o espuma,

misma que las cubre totalmente; esta “saliva” o masa espumosa les confiere refugio, sirve como defensa contra sus enemigos naturales y como protección de las condiciones climáticas adversas. (Marshall, 1966, Whittaker, 1970, Bodegas, 1973).

1.2 Distribución de la mosca pinta

La mosca pinta presenta una amplia distribución geográfica que va desde el Sureste de los Estados Unidos de América hasta el Noreste de Argentina y una distribución altitudinal que va desde los 0 hasta los 3000 msnm (Peck, 2001; Rodríguez *et al.*, 2003).

1.3 Métodos de manejo del salivazo

Dada la importancia de esta plaga, se ha desarrollado un programa de manejo integrado dirigido a la ruptura del ciclo biológico y por lo tanto a reducir principalmente la población de huevos y adultos. Las principales actividades dentro del manejo integrado de mosca pinta incluyen: (1) monitoreo poblacional de huevos, ninfas y adultos; (2) labores culturales (control de malezas y limpieza de drenes); (3) uso de la rastra fitosanitaria o el cultivador Lillinston para la exposición de huevos, (4) trampas adhesivas (monitoreo y control etológico); (5) control biológico de adultos; y (6) control químico como último recurso (Flores 1994, Garza y Sánchez 2007).

1.3.1 Manejo químico

Algunos insecticidas que se emplean para atacar ninfas están elaborados a base de etofolan, carbaryl y clorpirifos. Para el control de adultos se han recomendado carbamatos, clorofosforados, fosforados y piretroides (Menézes *et al.*, 1983).

1.3.2 Manejo cultural

Este tipo de control comprende prácticas mecanizadas de cultivo, que permiten la exposición de los huevecillos del salivazo al sol, al ambiente y a los enemigos naturales, mediante el uso de una cultivadora tipo Lilliston. Además se recomienda el uso de trampas pegajosas, iniciar con 5 trampas/ha (cinco de oros o en forma diagonal) a los 15 a 20 días después de las primeras lluvias e ir incrementando el número paulatinamente hasta llegar a 40 trampas/ha durante el periodo lluvioso (Gómez, 2007), se recomienda además disminuir la humedad al proporcionarle a las plantas de caña de azúcar buen drenaje interno y superficial para evitar la aparición de raíces adventicias que sirven de alimentación a las ninfas (Gaviria y Rodríguez, 2004).

1.3.3 Control biológico

1.3.3.1 Enemigos naturales de la mosca pinta

Se ha documentado la existencia de insectos depredadores en condiciones de campo afectando poblaciones de ninfas. Valerio (1988) menciona a *Salpingogaster nigra* (Schiner) y *S. pighora* (Schiner) pertenecientes a la familia *Syrphidae*. Además, se reportan hormigas del genero *Solenopsis* y varios micro himenópteros, parasitoides de huevos (*Oligosita giraulti* Crwf, *Anagrus sp.* y *Centrodora tomaspidis* y *Acmopolynema hervali* (Arango y Calderón, 1981). Por otro lado el CIAT, (2001) reporta *Apiomerus lamipes* un hemíptero Reduviido, arañas pertenecientes a la familia Salticidae. La hormiga *Pheidole genalis* (Hymenoptera: Myrmicinae) la cual es empleada como depredador de *M. fimbriolata* en Brasil (Mendonça, 2005). Bennett (1984), menciona además al mimárido parásito de huevos, *Anagrus urichi*, al redúvido *Castolus plagiaticollis*, *Zelus rubidus*, *Acmopolynema hervali*, *Oligosita giraulti*, *Centrodora tomaspidis*, y a los hongos entomopatógenos *Conidiobolus coronatus* (Entomophthorales), *Metarhizium anisopliae* (Metchnikof) Sorokin (Ascomycota: Hypocreales) (Torriello y Mier 1985, Reumaudiere y Latge 1985)

El uso del hongo entomopatógeno *M. anisopliae* (Metchnikof) Sorokin (Ascomycota: Hypocreales se ha extendido a Venezuela (Zambrano *et al.* 1989), Costa Rica (Badilla 2002, Carballo y Falguni, 2004), Nicaragua, Guatemala (Castillo-Zeno 2006), Colombia (Bustillo y Castro 2011) y México (Flores, 1994, Berlanga *et al.* 1997; Hernández-Rosas, 2013).

1.3.3.2 Hongos entomopatógenos- *Metarhizium anisopliae*

Destaca el uso del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Metchnikof) Sorokin para el control de adultos de mosca pinta. Los hongos entomopatógenos afectan tanto al estado de ninfa como a los adultos (Obando *et al.* 2011). Las ninfas disminuyen sus movimientos, la producción de espuma y pueden abandonar los sitios donde se alimentan. Los adultos infectados presentan movimientos lentos, dejan de alimentarse, reducen su radio de vuelo, las hembras no ovipositan (Castillo-Zeno 2006) y pueden morir en lugares distantes en donde fueron contaminados. El uso de *Metarhizium* como insecticida biológico ha sido generalizado en diferentes áreas cañeras, principalmente para la regulación de adultos de la mosca pinta.

1.4 Nematodos entomopatógenos

En cuanto a los nematodos parásitos, Poinar y Linares (1985) en el estado de Portuguesa, Venezuela, encontraron infecciones naturales del nematodo *Hexameris dactylocercus*, parasitando hasta un 50% de ninfas y adultos recolectados de *Aeneolamia varia*. Bennett (1984) reporta a *Hexameris sp.* sobre *A. varia* en Trinidad, y en Brasil sobre *Mahanarva fimbriolata*. De igual manera Hernández *et al.* 2009a, mencionan la presencia de *Hexameris sp.* asociado con *A. albofasciata* en la región cañera de Córdoba, Veracruz. Sin embargo los intentos de propagación masiva de estos nematodos en el laboratorio, no han sido exitosos.

1.4.1 Importancia de los nematodos entomopatógenos *Heterorhabditis sp.* y *Steinernema sp.*

Los Nematodos entomopatógenos de las familias *Steinernematidae* y *Heterorhabditidae* y sus bacterias simbióticas han generado un interés significativo como estrategia inundativa de control biológico (Klein, 1990; Poinar, 1990). Poinar (1979) reporta que *Steinernema carpocapse* es capaz de infectar a 250 especies en 75 familias y 11 órdenes.

Los nematodos presentan ventajas importantes en el control de plagas; tienen la capacidad de desplazarse, buscar a su presa, adaptarse a condiciones adversas, pueden resistir agroquímicos, son específicos de insectos, además pueden presentar compatibilidad con otros entomopatógenos (Kaya 1990; Kaya y Koppenhöfer, 1996; Akhurst y Smith, 2002). Por lo que, se proponen como candidatos para el manejo biológico de insectos plaga.

1.4.2 Interacción de los NEPs con su hospedero

De acuerdo con Gaugler *et al.* (1994); Simoes y Rosa, (1996) la eficacia de los nematodos entomopatógenos varía debido a muchos factores biológicos, que pueden ser determinados por la especie, aislamiento, especie del insecto y estado de desarrollo.

La eficacia de la penetración de los nematodos puede ser afectada por: mayor defecación que reduce la infección por el ano en larvas de escarabajos, una baja producción de CO₂, o al contrario liberación abundante que disminuye las señales químicas en pupas de lepidópteros y larvas de escarabajos, la formación de capullos impenetrables, barrera física o individuos que matan al nematodo, por que evitan contaminación en su nido, comejenes, y además puede ser dado por una conducta de evasión a la presencia de nematodos entomopatógenos (Gaugler *et al.*, 1994, Koppenhofer *et al.*, 2000b). Los juveniles pueden penetrar al insecto utilizando varias vías, boca, ano, espiráculos, incluso la cutícula, en el caso de *Heterorhabditis* utiliza un diente para penetrar directamente hacia el hemocele (Eidt y Thurston, 1995). En el

caso de las ninfas de mosca pinta utilizan la saliva para evitar desecación y el ataque de enemigos naturales, se trata de un mucopolisacarido secretado por los tubos de malpigio (Marshall, 1966). Esta secreción podría constituir una barrera para la invasión de los nematodos entomopatógenos.

1.4.3 Ciclo de vida de los nematodos entomopatógenos

El ciclo de vida de los nematodos entomopatógenos es similar, aunque puede variar un poco entre las familias *Steinernematidae* y *Heterorhabditidae*. Sin embargo, en general de acuerdo con Poinar (1990) se presentan seis estadios, el huevo, cuatro estadios larvales y los adultos. Los esteinernematidos presentan dos ciclos sexuales, dentro del insecto, mientras tanto en heterorhabditidos su primer ciclo presenta hembras hermafroditas y el segundo un ciclo sexual.

Los juveniles infectivos penetran el hospedero ya sea desde el intestino o atravesando la cutícula a través de las membranas intersegmentales de los insectos. Una vez en el hemocele, los juveniles infectivos liberan células bacterianas asociadas mutualísticamente, que al multiplicarse y digerir los tejidos del huésped, proporcionan condiciones adecuadas de nutrientes para el crecimiento y desarrollo de los nematodos. El insecto huésped muere rápidamente, por lo general dentro de los 2 días siguientes a la penetración inicial de los nematodos. Los nematodos que han invadido el hemocele reanudan su desarrollo, mudan a la etapa de J4 y llegan a la edad adulta, estos dan origen a juveniles infectivos (JI), responsables de la diseminación y persistencia de los nematodos entomopatógenos (NEPs) en el suelo.

1.4.4 Nematodos entomopatógenos en el control de la mosca pinta

De acuerdo con Leite *et al.*, (2002), *Steinernema sp.*, y *Heterorhabditis sp.*, en el salivazo de la caña, *Mahanarva fimbriolata* logran mortalidades entre el 96 y el 100% bajo condiciones de laboratorio. Un estudio en campo, demostró que *Heterorhabditis sp.* causó mortalidad del 42,3% en dosis de 5×10^{10} JI/ha y *H.*

bacteriophora en dosis de $1,5 \times 10^{11}$ JI/ha, con mortalidad sobre ninfas de *A. varia* del 76% (Moreno *et al.*, 2012).

Sin embargo, al emplear nematodos entomopatógenos en condiciones de campo la infectividad de estos se reduce a pocas especies y estadios del insecto (Smits, 1996; Georgis, 1992), ello podría limitar el uso de los nematodos en el control biológico de la mosca pinta.

1.4.5 Factores bióticos y abióticos relacionados con la presencia de nematodos entomopatógenos

Los factores abióticos pueden tener un efecto positivo o negativo en el desempeño, efectividad y nivel de éxito de los nematodos entomopatógenos en el control de insectos plaga. Es por ello que la aplicación de nematodos entomopatógenos puede resultar impredecible en condiciones naturales, Por lo tanto, es necesario realizar una descripción de los principales factores que influyen en su efectividad biológica, estos factores pueden limitar su establecimiento en condiciones de campo. En este sentido Kaya, (1990); Kaya y Koppenhöfer, (1996); Smits, (1996) menciona la importancia de los factores de comportamiento y fisiológicos (intrínsecos) y temperatura, humedad, textura de suelo y radiación (extrínsecos), además los factores bióticos como competencia, que afectan su persistencia en el suelo.

1.4.5.1 pH en el suelo

El pH en el suelo puede afectar la sobrevivencia e infectividad de los nematodos entomopatógenos. Kung *et al.*, (1990) reportan que la sobrevivencia y patogenicidad de *Steinernema carpocapse* y *S. glaseri* disminuye levemente con cambios del pH (pH 8 a 4). Sin embargo, a pH 10 se declina la supervivencia de una manera drástica y no se presenta la habilidad para matar larvas de *G. mellonella*. La acidez del suelo también tiene un efecto importante en el nematodo. Al respecto, Fischer y Fuher (1990) señalan que con un pH debajo de 4, *S. kraussei* puede limitar su parasitismo en *Cephalcia abietis* L. (Hymenoptera) de una manera significativa.

1.4.5.2 Temperatura del suelo

Las temperaturas extremas debajo de 0°C y arriba de 40°C son letales para numerosos nematodos, dependiendo del tiempo de exposición y la especie (Brown y Gaugler, 1996; Griffin, 1993). El efecto de la temperatura sobre la sobrevivencia de los nematodos varía con las distintas razas y especies (Grewal *et al.*, 1994; Glazer *et al.*, 1996, Baker y Capinera, 1997). Al respecto, existen nematodos nativos adaptados a regiones templadas, *S. feltiae* y *H. megidis* son tolerantes a temperaturas frías del suelo, mientras que especies aisladas en regiones cálidas como *S. riobrave*, pueden tolerar exposiciones cortas a 42 °C.

En general la mortalidad de los insectos se reduce en temperaturas frías, debido a la disminución de la habilidad del nematodo para moverse a bajas temperaturas (Grewal, 1999). Muchas especies de nematodos, tienen la capacidad de infectar insectos hospederos en un amplio rango de temperatura, la infectividad se ve reducida arriba de 30°C y debajo de 15 °C.

1.4.5.3 Humedad

La humedad del suelo se considera el factor más importante que influye en la sobrevivencia de los nematodos entomopatógenos. Simons y Poinar, (1973) mencionan que más del 90% de los juveniles infectivos de *S. carpocapse* a 79.5% de humedad relativa después de 12 días, estaban vivos. Sin embargo, después de 4 días de exposición a 48.4% de humedad relativa, suelo seco, más del 80 % los nematodos sobrevivieron.

De acuerdo con Kaya (1990) los esteinernematidos pueden sobrevivir a baja humedad del suelo, similar a las condiciones naturales del suelo, sin embargo su capacidad de búsqueda del hospedero e infectividad puede reducirse. Asimismo, Molyneux (1985) menciona que en suelo arenoso y a 7 % de humedad con 15°C alrededor del 100% de *S. glasseri* sobrevivió por 24 semanas y cerca del 90% sobrevivió por 32 semanas. Por su parte, Kung *et al.*, (1991) probó que *S. carpocapse* y *S. glasseri* al colocarlos en un suelo

migajoso a diferentes humedades, ambas especies sobrevivieron bien con 2 y 4 % de humedad.

En este contexto, Brown y Gaugler (1997) evaluaron *H. bacteriophora* y *S. feltiae* en humedades relativas de 75, 85, 96 y 100% sobre larvas de *G. mellonella* y encontraron que ambos nematodos emergen a bajas humedades; estos autores concluyen que los juveniles infectivos pueden sobrevivir en condiciones ambientales adversas por periodos limitados, dentro del hospedero; pero bajas temperaturas y humedad impide la emergencia del cadáver y los JIs pueden morir.

1.4.5.4 Radiación solar

Es otro factor de suma importancia, y se ha registrado que los *heterorhabditidos* parecen ser más vulnerables a la luz ultravioleta comparados con los *esteinernematodos*. Gaugler y Boush (1978) y Gaugler *et al.*, (1992) mencionan que cuando *S. carpocapse* fue expuesto a luz solar este fue inactivado a los 60 min., mientras que *H. bacteriophora* fue más sensible y se inactivo a los 30 min., además señalan que bajo una lámpara UV simulando la intensidad solar los tiempos de inactivación de *S. carpocapse* fueron de 6 min. y para *H. bacteriophora* de 2 min. Por lo tanto se ha demostrado que el uso de protectores de radiación ultravioleta extiende la longevidad de los juveniles infectivos (Gaugler y Boush, 1979).

1.4.5.5 Textura

La textura del suelo puede afectar la movilidad, persistencia e infectividad del nematodo (Georgis y Poinar, 1983; Choo y Kaya 1991). Al respecto, Baker y Capinera, (1997) mencionan que las texturas más favorables son la arenosa y franco arenoso.

Kung *et al.*, (1990) evaluó las texturas arena-limo, limo-arcilla y arcilla durante 16 semanas en *S. carpocapse* y *S. glasseri*, la supervivencia más baja fue observada en suelos arcillosos para las dos especies. En suelos arcillosos y limo arcillosos, la tasa de mortalidad fue de 40-50% en las primeras dos

semanas, mismo que se estabilizo entre el 1 y 2 % por semana para *S. carpocapse* y 5 % por semana para *S. glaseri* y se sostuvo el decremento para *S. glaseri* entre 4 y 8 semanas. Por tal razón, Smith (1996) menciona que no solo se ve afectada la sobrevivencia de los nematodos sino que además en suelos arcillosos se ve reducida la infectividad.

1.4.5.6 Conductibilidad eléctrica

En suelos salinos los microorganismos enfrentan problemas de altas concentraciones de iones, arriba de sus concentraciones normales intracelulares, los cuales pueden conducir al rompimiento de la función celular (Barbercheck, 1992). La toxicidad a elevadas concentraciones de iones puede ser 1) el resultado del aumento de la presión osmótica y la subsecuente perdida de agua en los nematodos; 2) el desequilibrio en el balance iónico interno, 3) efectos tóxicos generales de los nitratos y nitritos, 4) o alteración del balance interno de ácido-base (Brown y Platzer, 1978).

Por lo tanto, el aumento de la tasa metabólica estimulada por las sales puede agotar los recursos energéticos de las etapas infectivas antes de hacer contacto con el hospedero, por lo que reduce el potencial infeccioso de los nematodos (Von Brand, 1943).

1.4.5.7 Diversidad biológica de microorganismos en la rizósfera

La rizósfera es el volumen de suelo inmediato a las raíces de las plantas y en donde se genera un conjunto de interacciones entre planta, suelo, microorganismos y microfauna. El número de microorganismos es alto debido a las influencia de la raíces y se pueden presentar modificaciones constantes en cuanto a la biodiversidad de los microorganismos generados por cambios físicos, químicos o biológicos en la raíces de la planta, que pueden ser generados por excreciones radiculares y desechos orgánicos. (Antoun y Prevost, 2005). Por tal razón, existen diferentes poblaciones de bacterias, actinomicetos, hongos, protozoos, virus y nematodos, etc. contenidos en la

rizósfera (Gregory, 2006). Estos microorganismos de la rizósfera resultan ser de gran importancia en los procesos de degradación de materia orgánica y formación de suelo, ciclos biogeoquímicos, fertilidad de plantas y protección frente a patógenos, degradación de compuestos xenobióticos, entre otros. (Nogales, 2005).

1.4.5.8 Factores bióticos relacionados con la persistencia de nematodos

La supervivencia y la efectividad biológica de los nematodos también puede verse limitada en gran medida por la disponibilidad del hospedero y por la abundancia de los enemigos naturales (Baker y Capinera, 1997) (Kaya y Koppenhofer, 1996; Grewal, 1999). Se ha documentado la existencia de enemigos naturales como microartrópodos colémbolos y ácaros, quienes dependen del consumo de nematodos para su desarrollo y reproducción (Epsky *et al.*, 1998). De acuerdo con Baur *et al.*, (1998) cuando los nematodos se encuentran en desarrollo dentro del cadáver pueden ser atacados por distintos invertebrados carroñeros, que pueden afectar la sobrevivencia de los nematodos en el interior del insecto.

De acuerdo con Kaya y Koppenhofer (1996) existen hongos como *Hirsutella rhossiliensis*, *Arthrobotrys spp.* y *Monacrosporium spp.* que tienen la capacidad de infectar y atrapar a juveniles infectivos. Sin embargo estos efectos no han sido bien documentados en condiciones de campo. De acuerdo con Koppenhofer *et al.*, (1995), los hongos antes mencionados pueden suprimir al nematodo *Heterorhabditis hepialus*, este autor menciona que la supresión es menor cuando se presentan dos o tres hongos a la vez que cuando se presentan en forma independientes.

1.5 Componentes microbianos del suelo

1.5.1 Hongos

Los hongos constituyen la mayor masa microbiana, alcanzan hasta un 80%. Entre ellos sobresale el orden de los hongos imperfectos, como *Aspergillus*,

Penicillium, Fusarium, Phytophthora, Verticillium, etc. Sus principales funciones son heterotróficas sobre los restos vegetales y formación de simbiosis del tipo micorrízica y parasítica. En el suelo, los hongos interactúan con una compleja comunidad microbiana que incluye: bacterias, actinomicetos (actinobacterias) y pequeños invertebrados.

Los hongos son una parte importante de la cadena alimenticia en el suelo, principalmente para la mesofauna que habita en el suelo (Bonkowski *et al.*, 2000). Por otro lado, existen dificultades en cuanto al aislamiento de microorganismos y existen afirmaciones de que únicamente el 1% de los microorganismos del suelo son cultivables en medios axenicos, ello aumenta la dificultad de aislamiento y no se logra conocer la inmensa diversidad de microorganismos existentes (Rondon *et al.*, 2000).

1.5.2 Bacterias

Las bacterias de la rizósfera pueden generar un efecto neutral, benéfico o perjudicial en su desarrollo (Siddiqui, 2005). Además se considera al suelo como un ambiente complejo en cuanto a comunidades bacterianas y puede contener alrededor de 10^9 células bacterianas/gramo de suelo seco y un estimado de 10^4 especies microbianas diferentes por gramo de suelo (Cavaletti *et al.*, 2006). Sin embargo, la cantidad y el tipo de bacterias están determinados por el tipo de suelo, en especial por el contenido de arcilla, humedad, aireación, temperatura, materia orgánica y pH, así asimismo por el cultivo, estación del año, abundancia de protozoarios, principalmente, aunque pueden ser encontradas en ambientes opuestos (Alexander, 1980; Kirchner *et al.* 1993).

1.5.3 Actinomicetos

Son Bacterias Gram positivas que tiene la capacidad de formar filamentos ramificados, el orden comprende 63 géneros y constituyen aproximadamente del 20-60 % de la biomasa microbiana del suelo (Ezziyyani *et al.*, 2004).

Stanley, (1994) menciona que en su mayoría los actinomicetos son microorganismos mesofilos y crecen entre 25 °C a 30°C y es nulo su crecimiento a temperaturas bajas, a 5 °C. Se ha documentado que los suelos alcalinos y neutros suelen ser ambientes favorables para estos microorganismos; encontrándose además en pH de 6.5-8.0, en suelos con pH, por debajo de 5.0 están ausentes (Prescott, 2002). De acuerdo con Tate (2000) la diversidad y número de colonias varía considerablemente dependiendo de las características físicas, contenido de materia orgánica, pH y pueden ser encontrados en un rango de profundidad que va de 2 a 15 cm; sin embargo, en suelos fértiles las concentraciones fueron de 10⁶ UFC/g de suelo seco.

Los actinomicetos se encuentran ampliamente distribuidos en suelo y participan en la degradación de la materia orgánica, debido a la producción de terpenoides, pigmentos y enzimas extracelulares con los que son capaces de degradar la materia orgánica animal y vegetal (Ghanem *et al.*, 2000; Ezziyyani *et al.*, 2004). Además pueden aumentar su población en función de las cualidades de los suelos; son favorecidos con alto contenido de materia orgánica y con amplias reservas de carbono asimilable y humus. Por lo tanto la adición de materia orgánica estimula su multiplicación y actividad. Además los actinomicetos también pueden contribuir en el control biológico por la capacidad que tienen de producir enzimas degradadoras, como las quitinasas, glucanasas, peroxidasas entre otras, involucradas en el micoparasitismo (Tokala *et al.*, 2002). En especial, el género *Streptomyces* puede ejercer biocontrol sobre hongos fitopatógenos, produce sideróforos y sustancias que promueven el crecimiento vegetal.

1.6 Justificación

La mosca pinta es una plaga de importancia económica, presente en los diferentes ingenios cañeros, tiene repercusiones significativas en la producción de la biomasa de caña de azúcar. Al respecto, De la Cruz *et al.*, (2005) mencionan que por efecto de *Aeneolamia albofasciata* (=postica) el rendimiento por hectárea puede disminuir hasta en 9 ton/ha. De acuerdo con lo anterior, se plantea la

posibilidad de emplear nematodos entomopatógenos habitantes del suelo, en el control de ninfas de la mosca pinta, *A.albofasciata*.

Información básica que soporte la persistencia de nematodos entomopatógenos en suelo procedente de ingenios azucareros del estado de Veracruz, donde actualmente se presenta la plaga de mosca pinta es nula. Por tal razón, resulta importante la realización de este estudio e incluir algunos de los indicadores que permitan evaluar la calidad de los suelos, la diversidad biológica existente y evaluar el efecto sobre la permanencia de los nematodos entomopatógenos.

Este estudio permitirá conocer algunos de los factores involucrados con la actividad de los nematodos entomopatógenos como reguladores biológicos de la mosca pinta.

1.7 Objetivo general

Evaluar la patogenicidad de aislamientos nativos de nematodos entomopatógenos y su persistencia en diferentes tipos de suelo procedentes de tres ingenios azucareros del estado de Veracruz.

1.7.1 Objetivos particulares

- a) Evaluar la actividad patogénica de los NEPs sobre ninfas del salivazo, *A. albofasciata*
- b) Determinar las propiedades físico-químicas del suelo perteneciente a los ingenios azucareros de Motzorongo, Constanca y Potrero.
- c) Comparar la microflora presente en el suelo procedente de los tres ingenios.
- d) Evaluar la persistencia de dos cepas de nematodos entomopatógenos en suelo de los ingenios azucareros mediante el uso de larvas de *Galleria mellonella*, como insecto cebo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 SELECCIÓN DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS CONTRA NINFAS DE *Aeneolamia albofasciata*

En este experimento se realizó la determinación bajo condiciones de laboratorio, de la patogenicidad y capacidad reproductiva de tres aislamientos de nematodos entomopatógenos, dos de *Steinernema* y uno de *Heterorhabdis* sobre el salivazo de la caña de azúcar (Cuadro 1). Los nematodos provienen de colectas con insectos cebo, de suelos de ingenios azucareros del estado de Veracruz, México.

Cuadro. 1. Nematodos utilizados para la prueba de patogenicidad.

Tratamiento	Colecta	Procedencia
<i>Steinernema n.sp.</i> (CPVC12)	Suelo cañero/insecto cebo	Comalcoahuil y Mata-Borrego), Paso del Macho, Veracruz, México
<i>Steinernema sp.</i> (1) (Constancia) (CPVC13)	Suelo cañero/insecto cebo	Ingenio Constancia- Estrellita, Veracruz
<i>Heterorhabditis (Jareros)</i> (CPVG13)	Suelo campos de caña de azúcar	Ingenio la Gloria, Jareros, Veracruz
Control (sin nematodos)	-----	-----

2.1.1. Propagación de nematodos

Los nematodos fueron propagados sobre larvas de ultimo instar de *G. mellonella* (L) (Apéndice 1), y cosechados como juveniles infectivos (JI) mediante el método de trampas White (Kaya y Stock, 1997). Los JI se obtuvieron de diferentes lotes de larvas infectadas, fueron cosechados en diferentes fechas, esterilizados y usados en los ensayos de las diferentes repeticiones.

- ✓ *Sanitización de nematodos.* Los nematodos entomopatógenos (NEPs) fueron esterilizados con cloruro de benzalconio al 0.01%. La suspensión se centrifugó a 500 rpm durante 5 minutos, con el fin de eliminar los nematodos muertos presentes en el sobrenadante.

- ✓ *Determinación de la concentración de JI en suspensión.* La dosis de nematodos fue determinada en base a la cantidad de nematodos recomendada por placa de cultivo (120 JI cm²).
- ✓ *Almacenaje de los JI de cada aislamiento.* Los nematodos se mantuvieron oxigenados para disminuir la mortalidad a temperatura ambiente. Los nematodos se conservan en el Laboratorio de Patología de Insectos en suspensión acuosa, a temperatura ambiente.

2.1.2. Colecta y selección de ninfas del salivazo

La colecta de ninfas de *A. albofasciata* se realizó en el área cañera perteneciente al ingenio Potrero, en el sitio Atollaquillo, coordenadas 18° 59'38.74 Norte y 96°46'50 Oeste. Las ninfas fueron colectadas con pinzas de acero inoxidable, separadas por género y colocadas en organizadores de plástico, con cavidades, que contenían en su interior papel toalla humedecido y estolones de pasto estrella (*Cynodon sp*). Una prueba preliminar con estolones de pasto mostro que en la zona de los nudos se forman raicillas de diferente longitud, que permanecen activas durante varios días (10-12). Se consideró que si las ninfas podían adherirse a las raicillas y mantenerse al menos 4-5 días produciendo la secreción salivosa, constituiría un periodo favorable para que los nematodos entomopatógenos invadan y maten al salivazo.

2.1.3. Bioensayo

El procedimiento para la inoculación de los aislamientos de NEPs sobre ninfas de *A. albofasciata* fue el mismo. Se utilizaron placas COSTARD con 6 cavidades. Cada cavidad se cubrió con dos capas de papel filtro previamente humedecido y esterilizado. En cada perforación se colocó un estolón de pasto estrella (*Cynodon sp.*) (3.5 cm) en el cual se favoreció la emisión de raicillas (mantenidos en oscuridad total en una bolsa de plástico oscura), sobre estos se colocó una ninfa de 3er o 4º instar. La prueba se llevó a cabo aplicando una

sola concentración de juveniles infectivos, 120 JI/cm² (Alves *et al.*, 2005). La aplicación se realizó sobre el papel filtro permitiendo el desplazamiento de los JI y búsqueda del insecto hospedero. Los tratamientos se incubaron a 25±2 °C y humedad relativa de 74.32 Min y 84.25 Max, bajo 9 h luz y 15 h en oscuridad. Las ninfas testigo fueron expuestas a las mismas condiciones anteriores.

Los tratamientos fueron dispuestos en un diseño completamente al azar y cada tratamiento contó con cuatro replicas (cuatro placas/24 ninfas) y tres repeticiones en tiempo (Cuadro 2). El bioensayo tuvo una duración de 7 días considerados a partir de la aplicación de los juveniles infectivos.

Cuadro 2. Diseño experimental usado en la prueba de patogenicidad de Nematodos entomopatógenos sobre ninfas de *A. albofasciata*.

TRATAMIENTO	UE (una placa)	REPLICAS (placas)	NINFAS TOTALES (replica)	REPETICIONS EN TIEMPO	Total Ninfas/ UEs	TOTAL DE PLACAS
1. <i>Steinernema</i> . (CPVC12)	1	4	24	2	48	8
2. <i>Steinernema sp.</i> (CPVC13).	1	4	24	2	48	8
3. <i>Heterorhabditis sp.</i> (CPVG13)	1	4	24	2	48	8
4. CONTROL (sin nematodos)	1	4	24	2	48	8
TOTALES		16 placas	96 ninfas		192	32

2.1.4. Capacidad reproductiva de los NEPs

Las placas se revisaron cada 48 h, se determinó mortalidad de ninfas en cada tratamiento. Cada insecto muerto se colocó en cámara húmeda para determinar la capacidad reproductiva de los nematodos, mediante la evaluación del número de JI por cadáver y por aislamiento de nematodo. Los JI se colectaron durante un periodo de 4 a 5 días considerando los picos de mayor emergencia. Los

nematodos fueron colectados para su conteo, se consideraron 6 conteos de 20 μ l de la suspensión, el promedio se multiplico por 10 ml de suspensión final colectada por cada ninfa.

2.2 CARACTERIZACIÓN DE SUELOS PROCEDENTES DE POTRERO, MOTZORONGO Y CONSTANCIA, INGENIOS AZUCAREROS DEL ESTADO DE VERACRUZ

El objetivo de este estudio fue determinar las características físico-químicas de los suelos; la determinación de poblaciones microbianas; presencia de nematodos entomopatógenos nativos y efecto del tipo de suelo en la persistencia de NEPs.

Las muestras de suelo fueron colectadas en Córdoba Veracruz, México, en suelos pertenecientes a los ingenios azucareros de Constanica, Motzorongo y Potrero. El ingenio Constanica se encuentra ubicado en el Municipio de Tezonapa, tiene una superficie aproximada de 11 550 has. Se encuentra localizado dentro de la región de las llanuras del sotavento. Su clima es cálido-húmedo-regular con temperatura que fluctúa desde 21.6°C- 26 °C. La mayor precipitación se presenta entre junio y septiembre con un descenso en octubre, la precipitación pluvial va de 2300 mm hasta 1300mm. En temporada de estiaje puede llegar hasta 50 mm. El tipo de suelo predominante son los Luvisoles, Acrisoles y Vertisoles. En caso del Ingenio Motzorongo 18 273 has, las condiciones y características son muy similares al ingenio Constanica. En el caso del Ingenio Potrero 18, 254 ha con un área de influencia de acuerdo a puntos de muestreo realizados en campo es de 35,772 ha. El clima varía de templado regular, con temperatura promedio de 25 °C. Los tipos de suelos son Vertisoles, Acrisoles y Luvisoles (Sagarpa, 2009).

En cada ingenio azucarero se tomaron 13 puntos al azar, en una hectárea, eliminando 10 m de cada orilla para evitar algún efecto negativo en el muestreo. En el caso del ingenio Constanica y Motzorongo se consideraron 2 sitios, y para el ingenio Potrero se seleccionaron 4 sitios, teniendo un total de 8 sitios. Las

muestras de suelo fueron colectadas con una pala recta, tomando en cuenta el área dentro de un marco metálico de 30x30 cm de largo por ancho y de aproximadamente 10 cm de profundidad (altura), las muestras fueron colocadas en una bolsa de polietileno, mismas que fueron transportadas al laboratorio y conservadas a 4°C.

Se prepararon muestras compuestas, combinando las 13 sub-muestras de cada sitio por ingenio azucarero. Las muestras de suelo fueron colocadas en charolas de plástico, homogeneizadas, tamizadas extrayendo piedras y materiales duros.

2.2.1. Incidencia de NEPs nativos

En este experimento se consideraron las muestras de suelo de los 8 sitios, el objetivo fue determinar la presencia de nematodos entomopatógenos nativos que pudieran modificar los resultados de persistencia. Cada muestra de suelo, fue humedecida con agua destilada estéril hasta capacidad de campo (60%), verificado con el medidor de humedad Soil Moisture Meter. La unidad experimental consistió de un recipiente de plástico de 500 gr. de capacidad, en los que se adicionaron 500 gr. de suelo.

Diferentes grupos de 7 larvas de *G. mellonella* en último instar, confinadas en jaulas de malla metálica se distribuyeron por envase. Se usó un total 1456 larvas de *G. mellonella*. Cada recipiente se cubrió con una tapadera con finas perforaciones, para permitir la aireación constante, los recipientes fueron invertidos (Miduturi *et al.*, 1997a) e incubados en una cámara de cría con temperatura controlada a 25 ± 2 °C durante 7 días. En total se realizaron dos réplicas por suelo y localidad, las larvas se revisaron cada cuatro días, realizándose dos revisiones por envase, detectando presencia de síntomas, puntos necróticos, cambios de color. Las larvas enfermas fueron separadas, esterilizadas con hipoclorito de sodio al 0.5 % y lavadas con agua destilada (Poinar 1979 y Glazer 1992a) y se colocaron en cámaras húmedas durante 10-12 días con el fin de permitir el desarrollo de los nematodos y obtener juveniles infectivos (JI) (Kaya y Stock, 1997). A cada larva enferma se le dio seguimiento y se determinaron las muestras positivas a nematodos entomopatógenos.

2.2.2. Características físico- químicas del suelo

Del suelo de los ingenios azucareros antes mencionados se tomó una muestra de 500 gr, la cual fue tamizada en malla 10 y llevada al Laboratorio de Fertilidad de Suelos del Programa de Edafología, Colegio de Postgraduados, con el fin de caracterizar la propiedades físico-químicas, textura Boyoucos, pH, conductibilidad eléctrica, contenido de materia orgánica, Nitrógeno, fosforo y potasio (NPK).

2.2.3. Determinación de poblaciones microbianas- cultivables presentes en los suelos procedentes de tres ingenios azucareros

Los suelos, fueron analizados para estimar la diversidad de microorganismos. Se utilizó el método de dilución del suelo en placa, método más común para el aislamiento y estimación cuantitativa de bacterias y hongos. Muestras de 10 g de suelo de cada localidad, se tamizaron en malla No. 10 y se suspendieron en un matraz con 90 mL de agua destilada estéril (suspensión madre). Las muestras se agitaron durante 18 minutos en un agitador orbital, para posteriormente preparar diluciones seriadas (Dhingra y Sinclair, 1985). Un factor final de dilución de 10^{-3} ó 10^{-5} se consideró adecuado para el aislamiento de hongos, 10^{-4} - 10^{-6} para bacterias y actinomicetos 10^{-3} - 10^{-5} (**Cuadro 3**).

Cuadro 3. Diseño experimental desarrollado durante el ensayo: diversidad biológica.

Microorganismo	Diluciones seriadas		Replicas	Repeticiones/ tiempo	Sitios	Total
Hongos	10^{-3} - 10^{-5}	3	3	3	4	108
Bacterias	10^{-4} - 10^{-6}	3	3	3	4	108
Actinomicetos	10^{-3} - 10^{-5}	3	3	3	4	108

Una alícuota de 20 μ L de cada una de las diluciones se distribuyó, utilizando una varilla de vidrio en forma de L sobre la superficie de medio de cultivo específico. Se emplearon placas de agar nutritivo (AN) para bacterias, Papa Dextrosa Agar (PDA) para hongos y medio Agar Czapeck Dox con pH de 8 para actinomicetos. Por cada dilución se contó con tres repeticiones. Las placas se incubaron a 27 °C. La cuantificación de bacterias se realizó a los cuatro días después de la incubación, a los cinco días los hongos y los actinomicetos a los 7 días. Para realizar los conteos se seleccionó una sola dilución para cada grupo de microorganismos y muestra de suelo y estos se expresaron en unidades formadoras de colonias (UFC).

Las UFC por gramo de suelo seco al aire se calcularon al multiplicar el promedio aritmético del número de colonias/caja por el factor de dilución y el resultado se dividió entre el peso de suelo seco presente en la alícuota.

2.3. EFECTO DEL TIPO DE SUELO EN LA PERSISTENCIA DE NEMATODOS ENTOMOPATOGENOS EN CONDICIONES CONTROLADAS

Se consideró una muestra compuesta de suelo (combinación de las 13 submuestras por sitio) representativa de cada ingenio azucarero. El suelo se humedeció a capacidad de campo verificado con el medidor de humedad Soil Moisture Meter, y se colocó en recipientes de plástico de 500 gr de capacidad. La humedad se aforo a 60 % en todas las unidades experimentales, verificándose cada dos días.

2.3.1 Suelo, nematodos, insectos

En este experimento se examinó el efecto del tipo de suelo arcilloso, franco arcilloso, franco-arenoso-arcilloso y franco arenoso, sobre la persistencia de *Steinernema sp* (CPVC12) y *Heterorhabditis sp.* (CPVG13) inoculados en el suelo se emplearon larvas de *G. mellonella* en el último instar como insectos cebo y como indicadoras de la persistencia de nematodos, debido a su alta susceptibilidad a la infección por nematodos entomopatógenos.

Los nematodos fueron reproducidos en larvas de *G. mellonella*, considerando lotes diferentes de nematodos para las diferentes repeticiones. Se inocularon 100 JI por larva para su multiplicación y a los 11-12 días se realizó la colecta de juveniles en trampas White (Woodring y Kaya, 1988).

2.3.2 Preparación de la suspensión

De la suspensión madre de cada especie de nematodo se obtuvieron 10 muestras de 20 μ L, en donde se determinó el número promedio de JI vivos. Por último se calculó la cantidad de microlitros de suspensión necesarios para aplicar 5 000 JI en cada unidad experimental, por repetición.

2.3.3 Unidad experimental

En envases de medio litro se colocaron 500 gr de suelo, y se agregaron 5000 juveniles infectivos suspendidos en 2.5 mililitros de agua destilada estéril, estos se aplicaron en la parte central de las unidades experimentales. El trampeo se inició en envases separados en 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 y 70 días después del tratamiento. Pasadas 24 horas, en un primer grupo de UE (unidades experimentales) se introdujeron siete larvas de *G. mellonella*, sometidas a choque térmico a 58 °C durante 8-10 segundos, confinadas en jaulas de malla metálica de 1 cm de diámetro por 4 cm de longitud, se expusieron a los nematodos por seis días, posteriormente se extrajeron los dispositivos, registrando el número de larvas muertas por tratamiento. A partir del día 7, se determinó la humedad y se agregó agua en caso de observarse variación. Las evaluaciones se realizaron semanalmente y el experimento tuvo una duración aproximada de 10 semanas, el muestreo fue destructivo (Fig. 1). Los experimentos se desarrollaron a 25 ± 2 °C, bajo obscuridad total.

2.3.4 Diseño experimental

El experimento se realizó bajo un diseño completamente al azar, se consideraron 4 tratamientos, incluyendo el testigo, con dos réplicas y dos repeticiones en tiempo, por tratamiento. La evaluación de las unidades experimentales se realizó semanalmente, siete días después de haber introducido las larvas, el muestreo fue destructivo. En total se consideran cuatro sitios (1 de Constancia, 1 de Motzorongo y 2 de Potrero) por tratamiento, correspondiendo a un total de 320 unidades experimentales (3 tratamientos x 4 sitios x 2 réplicas x 2 repeticiones x 10 observaciones semanales). Las evaluaciones se realizaron semanalmente y el experimento tuvo una duración aproximada de 10 semanas (Fig. 1). Se realizaron dos repeticiones del experimento, mantenidos a 25 ± 2 °C, bajo obscuridad. Las larvas infectadas eran transferidas a cámara húmeda, a la espera de la emergencia de los juveniles infectivos.

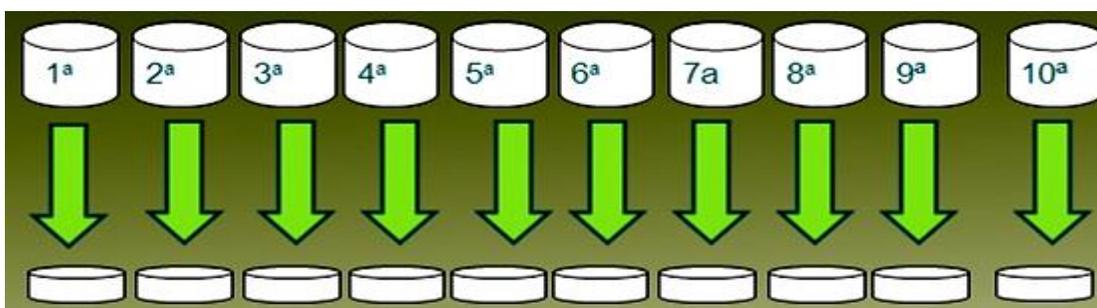


Figura 1. Diagrama de muestreo semanal (70 días de evaluación) de la mortalidad de *G. mellonella* en suelo. Depósitos (1-10) en donde se colocó el suelo de diferentes localidades, la suspensión de nematodos y los insectos cebo. La flecha indica la colecta de larvas infectadas, sanitizadas y mantenimiento de las mismas en cámara húmeda.

2.3.5 Análisis estadístico

El experimento se estableció como un diseño completamente al azar, y se realizaron dos repeticiones en tiempo con dos réplicas por suelo. Los datos de las dos repeticiones de cada tratamiento fueron combinadas y sujetas a un análisis de regresión logística, evaluando la persistencia de los JI en base a la mortalidad semanal de larvas de *G. mellonella*, bajo un diseño experimental destructivo, con unidades experimentales limitadas a 10 semanas de evaluación (70 días).

3.0. RESULTADOS

3.1. PRUEBAS DE SELECCIÓN DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS SOBRE NINFAS DE SALIVAZO, *Aeneolamia albofasciata*

De manera general se observaron diferencias en mortalidad causada por *Steinernema sp.* (CPVC12), *Heterorhabditis sp.* (CPVG13), y *Steinernema sp.* (CPVC13). El porcentaje de mortalidad (62.5%) fue mayor para *Heterorhabditis* (CPVG13) a 25°C, comparado con *Steinernema* CPVC12 (56.25%) y *Steinernema sp.* CPVC13 (33.33%). A pesar de que se observó mortalidad en los tratamientos no fue posible realizar un análisis estadístico, ya que el tratamiento testigo mostro alta mortalidad por otras causas. Sin embargo, este experimento permitió demostrar que tanto *Steinernema* como *Heterorhabditis* tuvieron la capacidad de atravesar la saliva producida por las ninfas y penetrar la cavidad del insecto, causando infección.

Las ninfas infectadas por *Heterorhabditis* presentaron un color rojizo (Fig. 2b), mientras que las parasitadas por *Steinernema*, mostraron un color café amarillento (Fig. 2c). La disección de los cadáveres de ninfas infectadas permitieron verificar la capacidad reproductiva de los nematodos entomopatógenos (Fig. 3a y b). El análisis, de las ninfas expuestas a *Heterorhabditis* y *Steinernema* (CPVC12) mostró diferencias en cuanto a la abundancia de juveniles infectivos así como presencia de contaminantes internos (bacterias). En el caso de *Heterorhabditis* los contaminantes fueron menores, lo que aparentemente favoreció la presencia de mayor número de nematodos, 3500 JI por ninfa (Fig. 4).

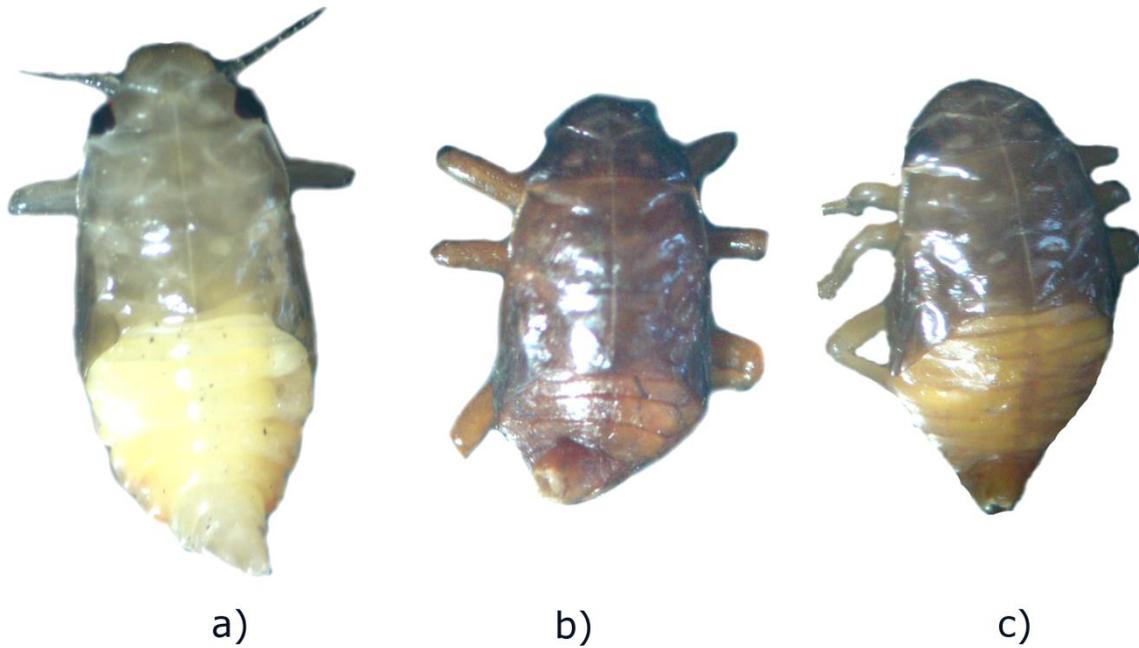


Figura 2. Ninfas de mosca pinta. a) Ninfa libre de parasitismo. b) Ninfa infectada por *Heterorhabditis* (CPVG13) c) Ninfa infectada por *Steinernema* (CPVC12).



Figura 3. Disecciones realizadas a ninfas parasitadas. a) Nematodos adultos de *Heterorhabditis* sp. (CPVG13) b) Nematodos Adultos de *Steinernema* sp. (CPVC12).

3.1.2 Mortalidad de ninfas de *Aeneolamia albofasciata*

La mayor mortalidad la obtuvo *Heterorhabditis sp.* (CPVG13), seguido de *Steinernema* (CPVC12) y finalmente *Steinernema sp.* (CPVC13), como se aprecia en la Fig. 4. (Obtenido del promedio de ninfas muertas por tratamiento de nematodos).

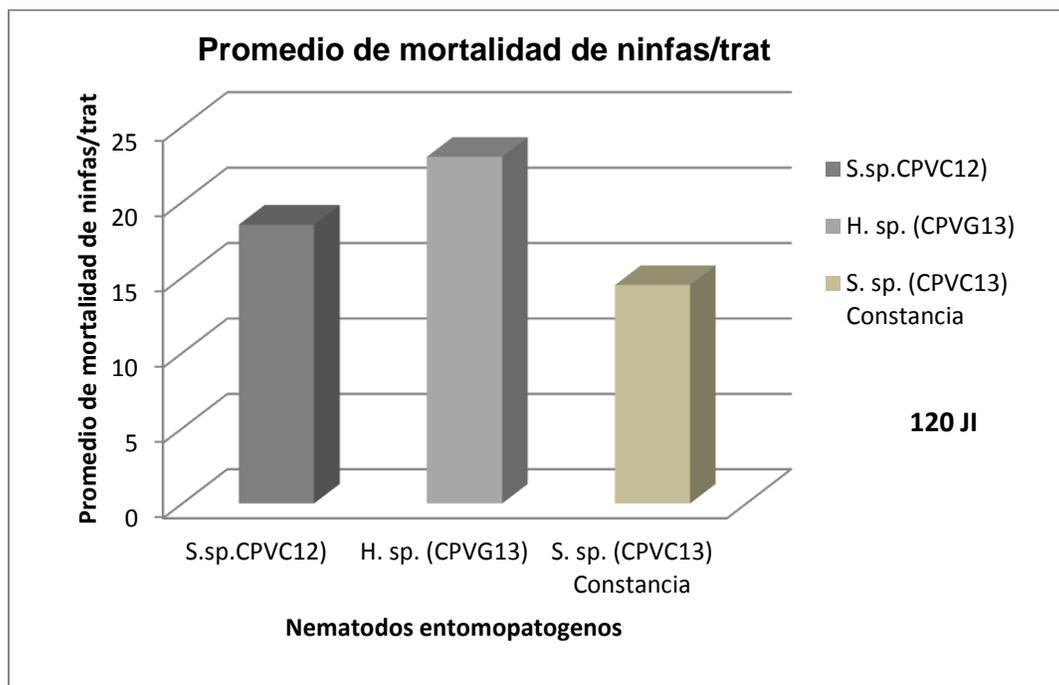


Figura 4. Proporción de mortalidad de ninfas por tratamiento (cepa de nematodos) *Steinernema* spp. (CPVC12; CPVC13), *Heterorhabditis* (CPVG13) en dosis única de (120 JI) por ninfa.

3.1.3 Capacidad reproductiva de JI

Los niveles de reproducción de los diferentes aislamientos variaron, por ejemplo la mayoría de las ninfas parasitadas por *Heterorhabditis sp.* (CPVG13) mostraron mayor proporción de juveniles infectivos comparados con *Steinernema sp.* (CPVC12) (Cuadro 4). Lo que podría considerarse como una mejor adaptación reproductiva de *Heterorhabditis* (CPVG13) en ninfas de *A. albofasciata* (Fig. 5).

Cuadro 4. Numero de nematodos obtenidos a partir de cada ninfa infectada, en suelo proveniente de los ingenios, Constanca, Motzorongo y Potrero.

Especie NEP /Repetición	% larvas infectadas	Población de JI/ninfa	
		mínima	máxima
Steinernema R1	13	4	1500
Steinernema R2	14	7	1500
Heterorhabditis 1	12	1000	3500
Heterorhabditis 2	18	10	3500
S. (Constancia) 1	6	9	1000
S. (Constancia) 2	10	4	1000
Control	0	-	-

3.1.4. Mortalidad ocasionada por otras causas

Durante el bioensayo se presentaron inconvenientes relacionados a mortalidad alta en el control, se observó la presencia de bacterias, 66.7% (32 ninfas muertas/48 tratadas) y nematodos mermitidos, 10.42% (5/48) emergiendo de ninfas durante el bioensayo. Además algunas ninfas mostraron ennegrecimiento de los tejidos (necrosis) (Fig. 5 a y b).

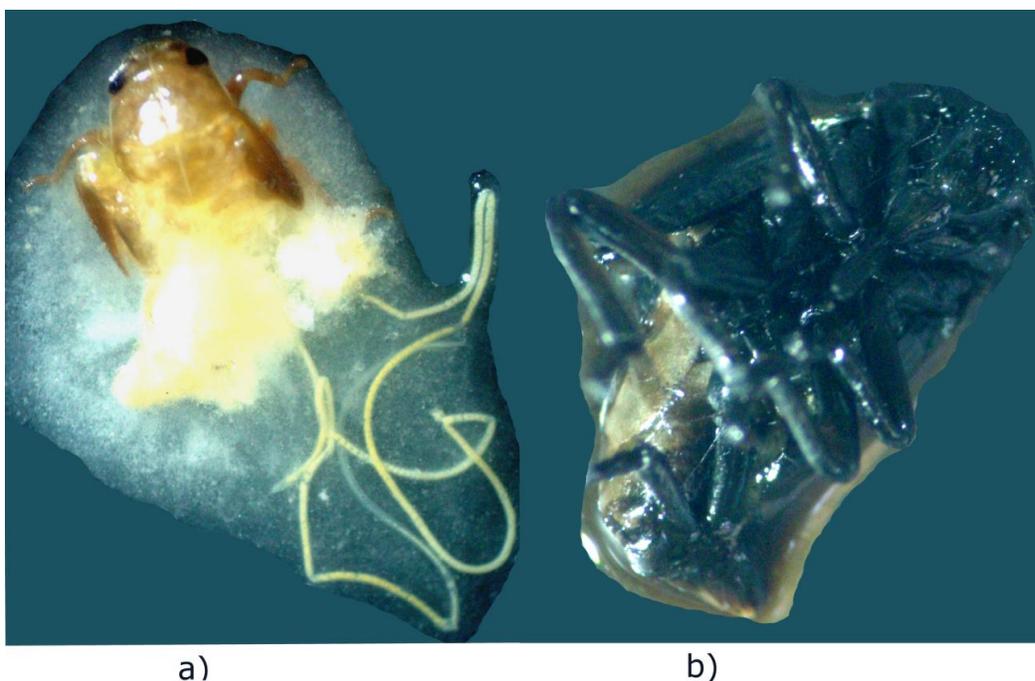


Figura 5. Parasitismo natural de ninfas de mosca pinta. a) Nematodos mermitidos. b) Ninfas ennegrecidas (necrosis), posible presencia de bacterias.

3.1 DIVERSIDAD BIOLÓGICA DE SUELOS PROCEDENTES DE INGENIOS AZUCAREROS DEL ESTADO DE VERACRUZ; POTRERO, MOTZORONGO Y CONSTANCIA

3.1.1 Características físico- químicas del suelo

Las características fisicoquímicas de los suelos empleados en los experimentos fueron determinadas por personal del Laboratorio de Física de suelos, del Colegio de Postgraduados y se presentan en el Cuadro 5. Los suelos en general se clasifican como arcilloso, franco arcilloso y franco arenoso, teniendo pH entre neutro (6.0-6.5) y ácido (4.8- 5.3).

Cuadro 5. Características físico-químicas del suelo de tres ingenios azucareros.

Identificación	pH	CE	M.O. (%)	N*	P	K	Textura Boyoucos			Clasificación
	1:2 *	1:5 H ₂ O	Walkley -	(%)	Olsen	NH ₄ OAc 1 N	arena	limo	arcilla	
	H ₂ O	mmhos/cm	Black	estimado	ppm	meq/100g	←	(%)	→	
		dS m ⁻¹				(cmoles+Kg ⁻¹)				
Potrero sitio 1	4.8	0.32	1.7	0.09	41	0.4	20	36	44	arcilla
Potrero sitio 2	5.1	0.28	5.4	0.27	64	0.7	22	24	54	arcilla
Potrero sitio 3	6.4	0.26	3.3	0.16	12	0.3	40	30	30	Fco. Arcilloso
Potrero sitio 4	5.3	0.14	5.3	0.26	15	0.3	24	25	51	arcilla
Constancia sitio 1	5.9	0.21	3.7	0.19	39	0.3	24	40	36	Fco. Arcilloso
Constancia sitio 2	6.5	0.16	5.3	0.26	31	0.4	22	36	42	arcilla
Motzorongo, Sitio 1	5.2	0.21	2.2	0.11	23	0.6	40	30	30	Fco. Arcilloso
Motzorongo, Sitio 2	6.0	0.23	1.4	0.07	18	1.0	54	26	20	Fco.arc.arenoso

CE: Conductibilidad eléctrica, MO: Materia Orgánica, N: Nitrógeno, P: Fosforo, K: Potasio.

3.1.2. Microorganismos cultivables - colonias de Bacterias, Hongos y Actinomicetos

La comunidad bacteriana (dilución 1×10^{-6}) mostró alta variación entre muestras. En el ingenio Constanca se encontró mayor densidad (3.2×10^9 UFC/gr de suelo), comparada con la observada en el ingenio Motzorongo (6.3×10^8 UFC/gr suelo) y los dos sitios del ingenio Potrero (1×10^9 UFC/gr) (Fig. 7a).

Las bacterias con mayor frecuencia, correspondieron a colonias amarillas y blancas, sin embargo en el sitio de Constanca la colonia blanca presentó mayor incidencia, además de encontrarse colonias con diversidad en colores (Fig.6).

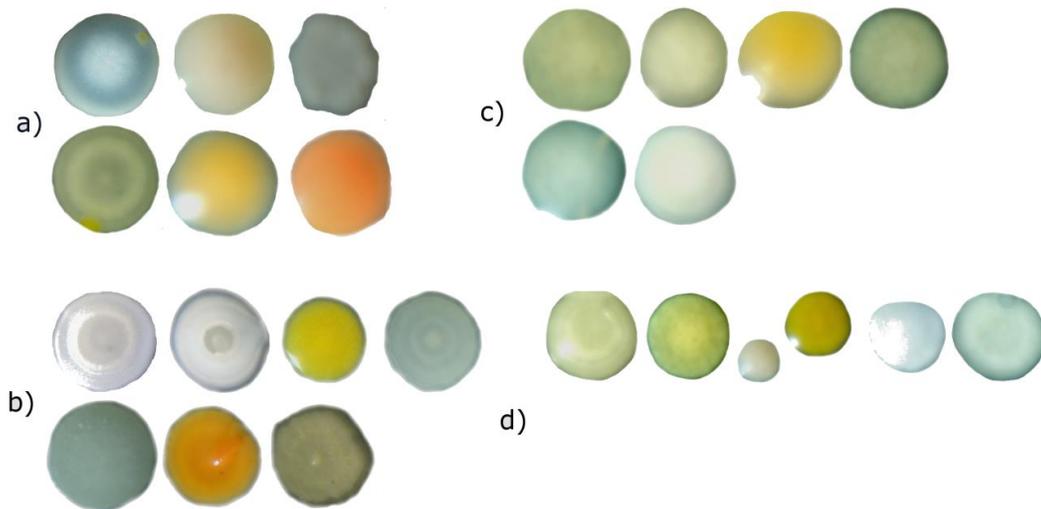


Figura 6. Colonias aisladas de suelos de ingenios azucareros. a) Sitio 1 Potrero, b) Sitio 2 Potrero c), Sitio 1 Ingenio Constanca, d) Sitio1 Ingenio Motzorongo.

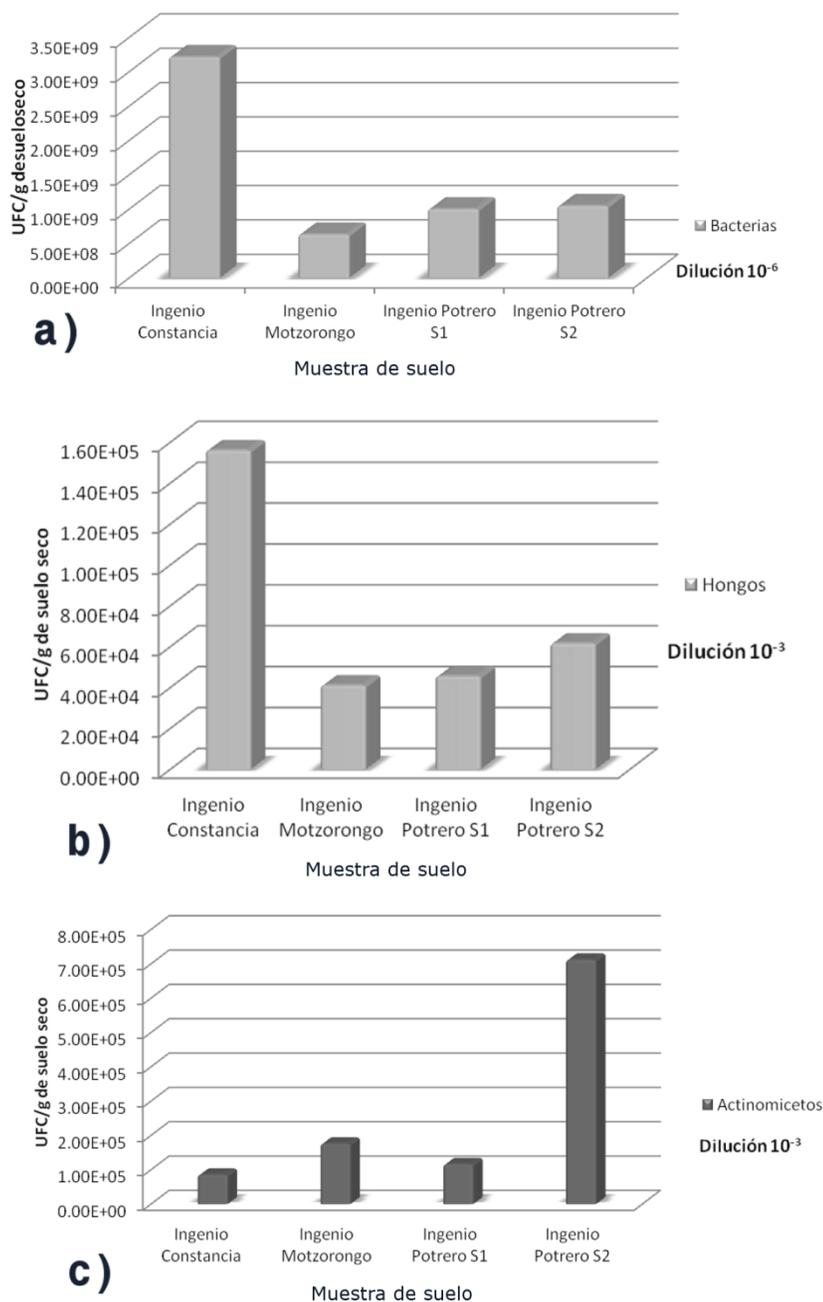


Figura 7. Unidades formadoras de colonias, a) bacterias, b) hongos y c) actinomicetos, obtenidas a partir de suelo proveniente de tres ingenios azucareros de Veracruz.

Las colonias de los actinomicetos a los dos días de realizado el estriado de la suspensión de suelo, presentaban un diámetro mínimo y máximo de 0.98 y 2.72 mm respectivamente. Los Actinomicetos, fueron muy abundantes en el sitio dos del ingenio Potrero (7.0×10^5 UFC/gr) (Fig. 7c). Por el contrario la concentración de

colonias de hongos fue menor (1×10^5 UFC/gr) (Fig 7b), se identificaron los hongos *Aspergillus sp*, *Penicillium sp.* y *Fusarium sp.*

3.1.3 Incidencia natural de Nematodos entomopatógenos

Se encontraron 3 muestras que resultaron positivas, estas pertenecen al ingenio de Constanca, la muestra 9 y 10 del sitio 1 (la Estrellita) repetición 1 y la muestra 1 del sitio 2, sitios caracterizados por ser franco arcillosos a arcillosos, con un pH de 5.9 a 6.5. Los aislamientos se identificaron como *Steinernema sp* (CPVC13).

Además, se encontró la presencia del hongo *Metarhizium sp.* Las muestras que resultaron positivas a la presencia de hongos del ingenio Constanca fueron: muestra 3 y 11 del sitio 1, y muestra 10, del sitio 2 (Cuadro 6). Las muestras positivas tanto a nematodos como a hongos no fueron incluidas en el ensayo de persistencia.

Cuadro. 6 Sitios trapeados y microorganismos encontrados sobre *G. mellonella*

SITIO	TIPO SUELO	pH	<i>Microorganismos trapeados</i>	
			NEPs/muestra	<i>Metarhizium sp./ muestra</i>
Potrero 1	arcilla	4.8	---	---
Potrero 2	arcilla	5.1	---	---
Potrero 3	Fco. Arcilloso	6.4	---	---
Potrero 4	arcilla	5.3	---	---
Constancia 1	Fco. Arcilloso	5.9	9-10	3 -11
Constancia 2	arcilla	6.5	1	10
Motzorongo 1	Fco. Arcilloso	5.2	----	---
Motzorongo 2	Fco.arc.arenoso	6.0	----	---

3.2 EFECTO DEL TIPO DE SUELO EN LA PERSISTENCIA DE NEMATODOS ENTOMOPATOGENOS *Heterorhabditis* (CPVG13) y *Steinernema CPVC12*

No hubo diferencias significativas entre los datos de las cuatro repeticiones

($\chi^2_3 = 1.3215$, $P=0.427$), lo que permitió que los datos se combinaran para hacer un análisis conjunto y ver el efecto de tratamientos (Cuadro 7). Se encontraron diferencias significativas entre los perfiles de persistencia entre *Heterorhabditis* (CPVG13) y *Steinernema* (CPVC12) ($\chi^2_1 = 64.3496$ $P < 0.001$). El aislamiento que persistió más fue el de *Steinernema spp* (Fig. 9) comparado con el aislamiento de *Heterorhabditis* (Fig.8). Se encontró un efecto significativo del suelo en la supervivencia de ambos nematodos ($\chi^2_3 = 11.2522$, $P=0.010$); sin embargo, este efecto fue diferente para cada aislamiento de nematodo ($\chi^2_3 = 17.3337$, $P < 0.001$), donde *Steinernema* a las 8 semanas mostró alta proporción de insectos muertos indicando alta persistencia de los JI, mientras que en las inoculaciones con *Heterorhabditis* la persistencia de JI empezó a declinar desde la 5ª semana de ocurrida la inoculación. El tiempo que transcurrieron los nematodos en el suelo tuvo un efecto significativo en su supervivencia ($\chi^2_9 = 462.3188$, $P < 0.001$), y este efecto fue similar para las dos especies de nematodos ($\chi^2_9 = 13.9253$, $P=0.125$) (Fig.8 y 9).

Cuadro. 7 Análisis estadístico, bioensayo persistencia de nematodos entomopatógenos.

Media	Desviación	Approx			
Change	d.f.	Desviación	Desviación	Proporción	chi pr
+ Repetition	3	1.3215	0.4405	0.44	0.724
+ Especies	1	64.3496	64.3496	64.35	<.001
+ Tratamiento	3	11.2522	3.7507	3.75	0.01
+ Tiempo	9	462.3188	51.3688	51.37	<.001
+ Especies.Tratamiento	3	17.3337	5.7779	5.78	<.001
+ Especies.Tiempo	9	13.9253	1.5473	1.55	0.125
+ Tratamiento.Tiempo	27	21.4889	0.7959	0.8	0.763
+ Especies.Tratamiento.Tiempo	27	12.4527	0.4612	0.46	0.992
Residual	237	86.7316	0.366		
Total	319	691.1743	2.1667		

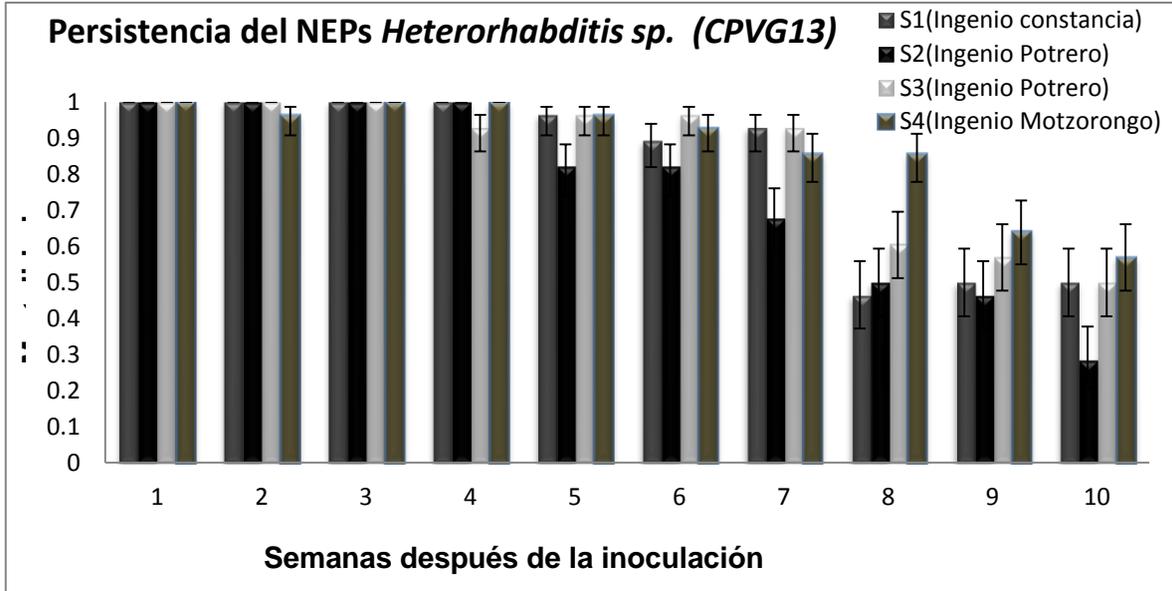


Figura 8. Proporciones de mortalidad obtenidas con *Heterorhabditis sp.* CPVG13 en larvas de *Galleria mellonella*. Las barras de error representan límites de confianza del 95%, transformada a partir de la escala logística. La persistencia de JI constituye el valor promedio de larvas muertas de *G. mellonella* por fecha de evaluación a 25°C.

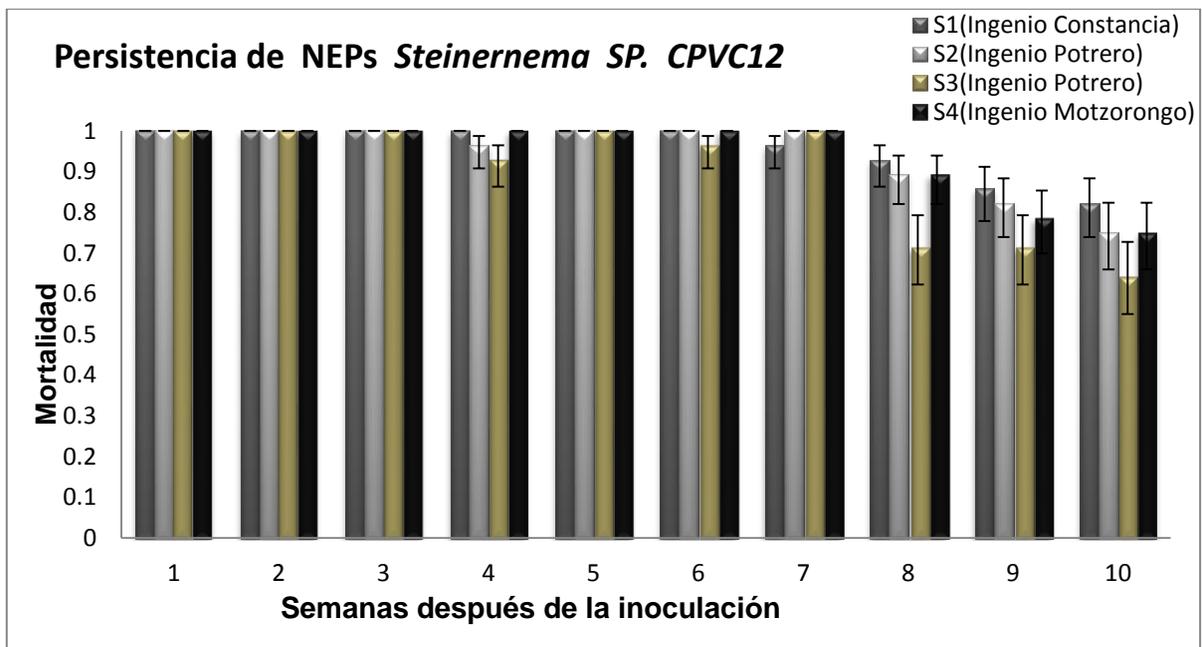


Figura 9. Proporciones de mortalidad obtenidas con *Steinernema* (CPVC12) en larvas de *Galleria mellonella*. Las barras de error representan límites de confianza del 95%, transformada a partir de la escala logística. La persistencia de JI

constituye el valor promedio de larvas muertas de *G. mellonella* por fecha de evaluación a 25°C.

4. DISCUSIÓN GENERAL

Nuestros resultados muestran que los aislamientos de nematodos entomopatógenos CPVC13; CPVC12 (*Steinernema*) y CPVG13 (*Heterorhabditis*) pueden infectar ninfas de *Aeneolamia albofasciata*, siendo capaces de atravesar las barreras físicas del insecto, principalmente la masa de saliva que les sirve de protección. La capacidad de infección de los aislamientos de nematodos utilizados puede ser confirmada por la reproducción de los mismos en su hospedante, especialmente por el aislamiento CPVG13 de *Heterorhabditis* (Cuadro 2), así como por previos reportes de infección en otras especies de hemípteros bajo condiciones de laboratorio, invernadero y campo (Leite *et al.*, 2005; Rosero, 2011; Morero *et al.*, 2012; Ferrer *et al.*, 2004). Se encontró una mayor infección ocasionada por *Heterorhabditis* comparada con *Steinernema*, lo cual podría ser atribuible a que los *Heterorhabditidos* tienen la capacidad de penetrar a través de la cutícula del hospedero con la ayuda de un pequeño diente que poseen (Bedding *et al.*, (1982) y Aguilera (2001). La alta mortalidad de ninfas de *A. albofasciata* en el testigo probablemente haya sido ocasionada por patógenos traídos de campo, así como por la manipulación al momento de ser colectados.

Uno de los factores de mortalidad natural observados en esta investigación fue la presencia de nematodos mermitidos del género *Hexameris*, fenómeno que ya ha sido reportado previamente en *A. varia* (Poinar y Linares, 1985) y *Manhanarva fimbriolata* (Bennett, 1984). Por esta razón, se considera importante que en futuros experimentos, el material biológico proceda de colonias de insectos mantenidos en condiciones controladas, evitando con ello alta mortalidad durante el bioensayo y obtener resultados estadísticamente confiables.

En el experimento de persistencia de nematodos entomopatógenos, se observaron diferencias significativas entre tratamientos y cepas de nematodos, lo que significa que hubo una disminución de la población inicial de nematodos a través del tiempo. Tanto en *Steinernema* como en *Heterorhabditis* la persistencia de JI medida como la capacidad de matar insectos cebo a través del tiempo,

mostro ligeras variaciones desde la cuarta semana, en el caso de *Steinernema* la mortalidad se mantuvo cercana al 100% hasta la séptima semana, sin embargo en la octava semana, la proporción de mortalidad mostro variaciones 0.65 a 0.9 dependiendo del suelo donde se incubo (Fig.8). En el caso de *Heterorhabditis* la persistencia de JI mostró variaciones más evidentes en las siguientes semanas. Al igual que *Steinernema*, a partir de la octava semana hubo una reducción en la persistencia de JI, pero en este caso la caída fue más drástica (0.25) (Fig.9).

Heterorhabditis mostró problemas de persistencia en los diferentes tipos de suelo (Fig. 9). En suelo arcilloso, franco arcilloso, y franco arenoso, con pH ácido a neutro (Cuadro 5) *Heterorhabditis* mostró una caída drástica en la curva de mortalidad, lo que significa que el suelo representa un factor importante para la persistencia de este nematodo entomopatógeno (Kung *et al.*, 1990; Portillo-Aguilar, 1999).

De acuerdo con Kaya, (1990); Kaya H. K. & A. M. Koppenhöfer 1996; Epsky., 1998, la interacción entre microorganismos del suelo y nematodos entomopatógenos puede afectar la sobrevivencia de los JI; afectar el establecimiento y/o desarrollo del simbiote, y afectar al insecto una vez que ha sido invadido por el nematodo. Sin embargo en este estudio se encontraron diferencias en la concentración de bacterias hongos y actinomicetos presentes en el suelo, que pueden tener relación con la persistencia de los nematodos entomopatógenos. La interacción nematodo vs microbiota pudo afectar de manera diferente la cepa de nematodos, provocando mayor mortalidad en *Heterorhabditis* (CPVG13). Sin embargo, faltan estudios más profundos para corroborar el efecto del suelo-microbiota sobre la persistencia y actividad parasítica de los nematodos entomopatógenos.

5. CONCLUSIONES GENERALES

Los nematodos entomopatógenos son capaces de atravesar la cubierta del salivazo, penetrar y matar, reproduciéndose en las ninfas de la mosca pinta, *Aeneolamia albofasciata*. Esto es indicativo de que la bacteria simbiote encuentra las condiciones favorables para su reproducción, proporcionando nutrientes para el desarrollo y reproducción de los nematodos entomopatógenos.

Ambas especies de *Steinernema* y *Heterorhabditis* son capaces de causar mortalidad, sin embargo existen diferencias entre aislamientos, considerando la proporción de insectos muertos.

El nematodo que causó mayor mortalidad sobre ninfas fue *Heterorhabditis* (CPVG13), además de tener una alta producción de JI. Estos resultados pueden ser una estrategia para la sobrevivencia y reproducción de los nematodos. Por el contrario, en el bioensayo de persistencia la mayor mortalidad a través del tiempo de *Heterorhabditis*, podría estar relacionada con la baja eficiencia del nematodo como competidor con la microbiota de suelo.

La población bacteriana y de hongos fue abundante en la rizósfera de caña de azúcar en el sitio muestreado del ingenio Constancia, mientras que la población de actinomicetos fue superior en suelo del ingenio Potrero, sitio2.

En el bioensayo de persistencia en suelo, se probó que el nematodo *Steinernema* CPVC12, persiste más tiempo en suelo en comparación a *Heterorhabditis* CPVG13, esto es indicativo de la capacidad de supervivencia de *Steinernema* en los diferentes tipos de suelo evaluados (arcilloso, franco arenoso) y que no se ve afectada su infectividad, pero si su capacidad reproductiva.

6. RECOMENDACIONES

Se considera importante establecer experimentos cuyo objetivo sea estudiar las poblaciones de microorganismos habitantes de la rizósfera de la caña de azúcar, interrelacionando los efectos bióticos, abióticos y de la planta sobre la dinámica poblacional de los microorganismos.

Se recomienda además, llevar a cabo evaluaciones sobre la capacidad reproductiva de nematodos y dar seguimiento a las causas de mortalidad de juveniles infectivos, una vez que invaden el hemocele del insecto hospedero.

Por otro lado, otro aspecto importante durante el experimento de persistencia fue la mortalidad de los juveniles infectivos de *Heterorhabditis* dentro de la larva de *G. mellonella*, al respecto, se recomienda continuar con otro trabajo de investigación que evalué la capacidad reproductiva de nematodos y de seguimiento a las causas de mortalidad interna de juveniles infectivos.

7. LITERATURA CITADA

- Alatorre Rosas R., Guadalupe Carrillo Benítez, Pedro F. Grifaldo Alcántara, Jorge Valdez Carrasco, Ariel W. Guzmán Franco, Jesús Romero Nápoles, Obdulia Segura de León, Francisco Hernández Rosas, José López Collado y Juan A. Villanueva Jiménez. 2013.** Identificación de especies de mosca pinta. Proyecto Nacional. "Diseño de un programa contemporáneo de manejo integrado de mosca pinta en caña de azúcar". FMP-002: 2pp
- Alves, L.F.A., Rohde, C., and Alves, V.S. 2005.** Patogenicidad de *Steinernema glaseri* en *S. carpocapsae* (Nematoda: Rhabdita) contra o cascudinho, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae), Neotropical Entomology, 34, 139141.
- Antoun, H Prevost, D. 2005.** The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. International Journal of systematic and evolutionary. Microbiology. 51: 797-814.
- Alexander, M. 1980.** Introducción a la Microbiología del Suelo. 2º ed. México, AGT. 491 p.
- Arango, S., G. y Calderón C., M. 1981.** Biología y hábitos de *Zulia colombiana* (Lallemand), plaga del pasto *Brachiaria spp.* Rev. Colomb. Entomol. 7:3-11.
- Akhurst, R. And Smith, K. 2002.** Regulation and Safety. In: Entomopathogenic nematology. CAB International 2002 (ed. R. Gaugler). p. 311-326.
- Badilla-Fernández F 2002.** Un programa exitoso de control biológico de insectos plaga de la caña de azúcar en Costa Rica. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica) 64: 77-87.
- Baur, M. E., Kaya, H. K. Gaugler, R. y Tabashnik, B. 1998.** Effects of adjuvants on entomopathogenic nematode persistence and efficacy against *Plutella xylostella*. Biocontrol Sci. Technol. 7:513-525.
- Bennett, F. D. 1984.** Discusión sobre las posibilidades de control biológico de la candelilla. In Seminario Problemas de la candelilla y el taladrador de la caña de azúcar y pastos (Barquisimeto, 1984). Unión de productores de azúcar. pp. 39-48.
- Berlanga-Padilla AM, Hernández-Velázquez VM. 1997.** Control microbial de mosca pinta *Aeneolamia spp.* con *Metarhizium anisopliae*. Dirección General

de Sanidad Vegetal, Comisión Nacional de Sanidad Agropecuaria. Ficha Técnica CB-08. 4p.

- Bodegas Varela, P., R. 1973.** Aspectos biológicos sobre la mosca pinta de los pastos, con énfasis en el periodo de incubación de los huevecillos de *Aeneolamia occidentalis* (Fennah). Tesis MC. Monterrey, N.L. ITESM. pp: 36-111.
- Bonkowski, M., Griffith, B. S. y Ritz, K. 2000.** Food preference of earthworms for soil fungi, *Pedobiologia*, vol. 44, pp. 666–676.
- Byers, R. A. y Wells, H. D. 1966.** Phytotoxemia of coastal bermudagrass caused by the two-lined spittlebug, *Prosapia bicincta* (Homoptera: Cercopidae) *Annals Entomol. Soc. Amer.* Vol. 59 (6). p. 1067-1071.
- Brown, B. J, y E. G. Platzer. 1978.** Salts and the infectivity of *Romanomermis culicivorax*. *Journal of Nematology*, 10:53-64.
- Brown, I. M., Gaugler, R. 1997.** Cold tolerance of steinernematid and heterorhabditid nematodes. *Journal of Thermal Biology* 21, 115-121.
- Brown, I. M., Gaugler, R. 1997.** Temperature and humidity influence emergence and survival of entomopathogenic nematodes. *Nematologica*, 43, 365-375.
- Bustillo-Pardley AE & Castro-Valderrama U 2011.** El salivazo de la caña de azúcar *Aeneolamia varia*. Obtenido en la Red Mundial el 10 de diciembre de 2012. http://www.cenicaña.org/pdf/serie_divulgativa/sd11/sd.pdf
- Calderón, M. 1983.** Salivita o Mión de los pastos, plaga importante de las gramíneas de América Tropical. *Revista de la Asociación de Ingenieros Agrónomos del Valle (ASIAVA)*. Julio – Septiembre. 38-39 p.
- Castillo-Zeno S. 2006.** Uso de *Metarhizium anisopliae* para el control biológico del salivazo (*Aeneolamia* sp. y *Prosapia* sp.) en pastizales de *Brachiaria decumbens* en el Peten, Guatemala. Tesis de Maestría en Ciencias. CATIE. 7 p.
- Cavaletti L. Monciardini P, Bamonte R, Schumann P. Rohde M. Donadio S. 2006.** New Lineage of Filamentous, Spore-Forming, Gram-Positive Bacteria from Soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 72: 4360-4369.
- Carballo, M., Falgumi, G. 2004.** Control biológico de plagas agrícolas. Serie Técnica: Manual Técnico No. 53. Nicaragua. p. 232.

- Choo, H. Y;Kaya, H. K. 1999.** Influence of soil texture and presence of roots on host finding by *Heterorhabditis bacteriophora*. Journal of Invertebrate Pathology 58 (2):279-280.
- De la Cruz, L.J.J. De la, J. Vera-Graziano, J. López-Collado, V.M. Pinto y R. Garza-García. 2005.** Una técnica simple para el desarrollo de ninfas de *Aeneolamia postica* (Homoptera: Cercopidae). Folia Entomol. Mex. 44: 91-93.
- Dinardo-Miranda, LI; Pivetta, Jp; Failure, Jv. 2006.** Efficiency of insecticides to control *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae) and its effects on the quality and productivity of cane sugar. Bioassay, v.1.
- Dinardo-Miranda, L.L.; Ferreira, J.M.G.; Carvalho, P.A.M. 2000.** Influência das cigarrinhas das raízes, *Mahanarva fimbriolata*, sobre a qualidade tecnológica da cana-de-açúcar. **STAB, Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v.19, p.34-35.
- Dinardo-Miranda LL, Pivetta JP & Fracasso JV 2008.** Economic injury level for sugarcane caused by the spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae). Scientia Agrícola 65: 16-24.
- Dhingra, O. D. y Sinclair, J. B. 1985.** Basic Plant Pathology Methods, CRC Press Inc., Boca Raton.
- Enkerlin, D., Morales, J.A. 1980.** The grass spittlebug complex *Aeneolamia albofoscata* and *Prosapia simulans* in northeastern Mexico and its possible control by resistant Buffelgrass hybrids. Miscellaneous Publication of the Texas Agricultural Experiment Station, pp. 1451. 470-494.
- Epsky, N. D., Walter, D. E., y Capinera, J. L. 1998.** Potential role of nematophagous microarthropods as biotic mortality factors of entomogenous nematodes (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae). Journal of Economic Entomology, 81:821-825.
- Ezziyyani M, Pérez C. Requena M, Ahmed A, Candela M. 2004.** Evaluación de biocontrol de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annum L.*) por tratamiento con *Burkhoderia cepacia*. 26:61-68.
- Flores-Cáceres S 1994.** Las plagas de la caña de azúcar en México. Servicios Gráficos OREL. Primera Edición. Veracruz, México. 350 p.

- Fischer, P. y Fuhrer, E. 1990.** Effect of soil acidity on the entomophilic nematode *Steinernema kraussei* Steiner. *Biology and Fertility of Soil*, 9 174-177.
- Fewkes, D. W. 1969.** The biology of sugar cane froghoppers, p. 283-307. En: Williams, J.R.; Metcalfe, J.R.; Montgomery R.W.; Mathes, R. (eds.). *Pests of sugar cane*. Elsevier, Amsterdam.
- Garza, U. E., Sánchez, G., C. 2007.** La mosca pinta *Aenolamia postica* y su manejo en la planicie Huasteca. INIFAF. No.16.pp 6-8.
- Gaugler, R. y Boush, G. M. 1978.** Effect of ultraviolet radiation y sunlight on the entomogenous nematode. *Environmental Entomology*, 8 810-813.
- Gaugler, R., Boush, G. M. 1979.** Laboratory test on ultraviolet protectants of an entomogenous nematode. *Enviromental Entomology*. 8 810-813.
- Gaugler, R. Glazer, Campbell, J. F., y Liran, N. 1994.** Laboratory and field evaluation of entomopathogenic nematode genetically selected for improved host-finding. *J. Invertebr. Pathol.* 63(1):68-74.
- Gaugler, R., Bednarek, A., y Campbell. J. F. 1992.** Ultraviolet inactivation of heterorhabditid and steinernematid nematodes. *Journal of Invertebrate Pathology* 59, 155-160.
- Gaviria, M. J y Rodríguez, Ch. J. 2004.** El salivazo o mión de los pastos en la cañicultura Colombiana. *Tecnicaña. Capacitación Técnica para la Agroindustria*. Vol 8 (15). p. 4-12.
- Georgis, R. y Poinar, G.O.JR. 1983.** Effect of soil texture on the distribution and infectivity of *Neoplectana carpocapsae* (Nematoda: Steinernematidae). *Journal of Nematology*, 15, 308-312.
- Gómez, L. A. 2007.** Manejo del salivazo *Aeneolamia varia* en cultivos de caña de azúcar en el valle del río Cauca. *Cenicaña, Cali, Colombia*. 10-17 p.
- Gregory, P. 2006.** Roots, rhizosphere and soil: the route to a better understanding of soil science?. *European Journal of Soil Science*. 57: 2-12.
- Glazer I., Klein M., Navon A., Nakache Y. 1992.** Comparison of efficacy of entomopathogenic nematodes combined with antidesiccants applied by canopy sprays against 3 cotton pest (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 85:1636-1641.

- Glazer, I., Kozodoi, E., Hashmi, G., y Gaugier, R. 1996.** Biological characteristics of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis sp.* IS-5: a heat tolerant isolate from Israel. *Nematologica*, 42, 481-492.
- Ghanem NB, Sabry SA, El-sherif ZM, Abu EI- Ela GA. 2000.** Isolation and Enumeration of marine Actinomycetes from seawater and sediments in Alexandria, *Applied and Environmental Microbiology*. 46:105-111.
- Grewal, P. S., Selvan, S. y Gaugier, R. 1994.** Thermal adaptation of entomopathogenic nematodes: niche breadth for infection establishment, and reproduction. *Journal of Thermal Biology*, 19, 245-253.
- Grewal, P. S. 1999.** Production, formulation and quality. En: Optimal use of insecticidal nematodes in pest management S. Polavarapu (Ed.), New Brunswinck, New Jersey: Rutger University. pp 15-24.
- Hernández-Rosas F, Real-Luna N & Ortiz–Martínez J. 2009b.** Entomopatógenos asociados a la rizósfera de la caña de azúcar con incidencia de mosca pinta, pp 246- 249. *En: Zapata-Mata R, Contreras-Sánchez WM, Granados Berber AA & Arriaga-Weiss SI (eds), Memorias XXXII Congreso Nacional de Control Biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico. Noviembre de 2009, Villahermosa, Tabasco, México.*
- Hernández Rosas Francisco, Marisol Cruz Tobón, Rosario Pacheco Coeto, Gloria T. González Vázquez y Jesús Ortiz Martínez. Esporas de *Metarhizium anisopliae* y Efecto en mosca pinta. 2013.** Proyecto Nacional. "Diseño de un programa contemporáneo de manejo integrado de mosca pinta en caña de azúcar". FMP-008: 2pp
- Kaya, H. K. 1990.** Soil ecology. *In: Gaugler, R. & H. K. Kaya (eds).* Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 93–116.
- Kaya, H.K., Gaugler R. 1993.** Entomopathogenic nematodes. *Annual Review of Entomology* 38: 181-206.
- Kaya, H. K. & A. M. Koppenhöfer 1996.** Effects of microbial and other antagonistic organism and competition on entomopathogenic nematodes. *Biocontrol Science Technology*, 6: 333-345.

- Kaya, H.K., Stock, S. P., 1997.** Techniques in insect nematology. En: Lacey, L. A. (Ed.), Manual of Techniques in insect Pathology. Academic Press, New York, pp. 281-324.
- Koppenhöfer, A. M. Kaya, H. K, y Taormino, S. 1995.** Infectivity of entomopathogenic nematodes (Rhabditida:Steinernematidae)at different soil depths and moistures. J. Invertebr. Pathol. 65:193-199.
- Koppenhöfer, A. M., Grewal, P. S. y Kaya, H. K. 2000b.** Synergism of imidacloprid and entomopathogenic nematodes against white grubs:the mechanism Entomol. Exp. Appl. 94:283-293.
- Koppenhöfer, A. M., Grewal, P. S., and Fuzy, E. M. 2006.** Virulence of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora*, *Heterorhabditis zealandica*, and *Steinernema scarabaei* against five white grub species (Coleoptera: Scarabaeidae) of economic importance in turfgrass in North America. Biological Control 38:397–404.
- Kirchner M. J., A. A. G. Wollum II y L. D. 1993.** King Soil Microbial populations and activities in reduced chemical input agroecosystems, en *Soil Sci. Soc. Am. F.*, Vol. 57. pág. 1289.
- Kung, S.P., Gaugler, R., Kaya, H. K.,y Vail, P. 1990.** Soil type and entomopathogenic nematode persistence. Journal of invertebrate Pathology, 55 401-406.
- Kung, S. P. Gaugler, R., y Kaya, H. K. 1991.** Effects of soil temperatura, moisture, and relative humidity on entomopathogenic nematode persistence. Journal of Invertebrate Pathology, 57, 242-249.
- Klein, M. G. 1990.** Efficacy against soil-inhabiting insect pests. pp. 195–214 in R. Gaugler and H. K. Kaya, eds. Entomopathogenic nematodes in biological control. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Leite, L.G., L.A. Machado, M.M. Aguilera, R.C.D. Rodrigues & A.S. Negrisoni Jr. 2002.** Patogenicidade de *Steinernemae*, *Heterorhabditis* (Nematoda: Rhabditida) contra ninfas da cigarrinha-das-raízes da cana-de-açúcar, Mahanarva fimbriolata (Hemiptera: Cercopidae). Rev. Agric. 78: 139-148.
- Leite L.G.Machado L.A., Goulart R.M., Tavares F. M.,Filho B.A. 2005.** Screening of Entomopathogenic Nematodes (Nemata: Rhabditida) and the

Efficiency of *Heterorhabditis* sp. against the Sugarcane Root Spittlebug *Mahanarva fimbriolata*(Fabr.) (Hemiptera: Cercopidae) Neotropical Entomology 34(5):785-790.

Mendoza, J.R. 2001. Bioecología del Salivazo de la caña de azúcar, *Mahanarva andigena* (Hom: Cercopidae) en el Ecuador. Mamorias del I Taller Latinoamericano sobre plagas de la Caña de Azúcar. Guayaquil. pp.: 40-47.

Mendonça, A. F.; Florez, S.; Saénz, C. E. 2005. Cigarrinhas da-cana-de-açúcar na América Latina e Caribe. p. 51-94. En: Cigarrinhas da-cana-de-açúcar. Controle biológico. Mendonça, A.F (ed.). Insecta. Maceió, Brasil. p. 317.

Menézes, M., El-Kadi, M.K., Pereira J. & Moreno, M.A. 1983. Bases para o controle integrado das cigarrinhas-das-pastagens naregiao, Sudeste da Bahia. Comissao Excutivo do Planoda Lavoura Cacauera – Centro de pesquisas do Cacau. (CEPLAC/ CEPEC) Ilhéus, Bahía Brasil pp 35.

Moreno A.C., Bustillo P. E. A., Núñez L.C.J., Valderrama C. U., Ramírez S. D. G. 2012. Virulencia de nematodos entomopatógenos para el control del salivazo *Aeneolamia varia* (Hemiptera: Cercopidae) en caña de azúcar. Revista Colombiana de Entomología 38 (2): 260-265.

Molyneux, A. S. 1985. Survival of infective juveniles of *Heterorhabditis* spp. and *Steinernema* spp. (Nematoda: Rhabditidae) at various temperatures and their subsequent infectivity for insects. Revue de Nematologie, 8, 165-180.

Miduturi J. S., Moens M. 1997a. Distribution of entomopathogenic nematodes in a grassland. Russian J. Nematol. 5(1): 67-70.

Nogales B. 2005. La microbiología del suelo en la era de la biología molecular: descubriendo la punta del iceberg. Ecosistemas. pp 1-10.

Obando, B. J.; Bustillo, A. E.; Castro, V. U.; Ramírez, G. D.; Moreno, G. C.; Mesa, N. C 2011. Selección de cepas de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin para el control de *Aeneolamia varia* (F.) (Hemiptera: Cercopidae). En: Resúmenes, Congreso Sociedad Colombiana de Entomología. 38. Manizales pp 27-29.

Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y alimentación. FAOSTAT 2011. <http://faostat.fao.org/#>.

- Peck, D.C. 1998.** Natural history of the spittlebug *Prosapia nr. bicincta* (Homoptera: Cercopidae) in association with dairy pastures of Costa Rica. *Annals of the Entomological Society of America*. Vol. 91. pp. 435-444.
- Peck, C., D. 2001.** Diversidad y distribución geográfica del salivazo (Homóptera: cercopidae) asociado con gramíneas en Colombia y Ecuador. *Revista Colombiana de Entomología* 27(3-4): 129-136.
- Peck, D., C., Pérez, A.M; Medina, J.W. 2003a.** Biología y hábitos de *Aeneolamia reducta* y *A. lepidior* en la Costa Caribe de Colombia. *Pasturas Tropicales* 24(1):16-26.
- Prescott, L. M. 2002.** Microbiology. 5th ed. Editorial McGraw-Hill. Boston Massachusetts, USA. Pp 524-528.
- Portillo-Aguilar C., M. G. Villani M. J. Tauber C. A. Tauber and J. P. Nyrop. 1999.** Entomopathogenic nematode (Rhabditida: Heterorhabditidae and Steinernematidae) response to soil texture and bulk density. *Environmental Entomology* 28:1021-1035.
- Poinar, G. O., Jr. Thomas, G. M. 1966.** Significance of *Achromobacter nematophilus* Poinar and Thomas (Achromobacteriaceae:Eubacteriales) in the development of the nematode DD136 (*Neoplectana* sp., Steinernematidae). *Parasitology* 56: 385-390.
- Poinar, G. O., Jr. 1979.** Nematodes for biological control of insects. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Poinar, G. O, Jr, Linares, B. 1985.** *Hexamermis dactylocerus* sp.n. (Mermithidae: Nematoda) a parasite of *Aeneolamia varia* (Cercopidae: Homoptera) in Venezuela. *Revue de Nematologie*. Vol. (8). pp. 109-111.
- Poinar, G. O., Jr. 1990.** Biology and taxonomy of Steinernematidae and Heterorhabditidae. Pp. 23–62 in R. Gaugler and H. K. Kaya, eds. *Entomopathogenic nematodes in biological control*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Reumaudiere, G. y Latge JP 1985.** Importancia de los hongos patógenos de insectos (especialmente Aphididae y Cercópidae) en México y perspectivas de uso. *Bol. Ser. Plagas*. 11: 217-225. Obtenido en la Red Mundial el 18 de

octubre de 2012. <http://www.magrana.gob.es/ministerio/pag5/biblioteca/plagas/BSUP-11-02-217-225>.

- Rodríguez, Rodríguez, D.I. 1979.** Evaluación del daño causado por cuatro densidades de población de ninfas del complejo mosca pinta *Aeneolamia albofasciata* y *Prosapia simulans* sobre cuatro híbridos de zacate buffel *Cenchrus ciliaris* a nivel de invernadero. Tesis IAP. Monterrey, México. ISTESM. 63p.
- Rodríguez CH,, Castro V., Morales A., R., Peck C.D. 2003.** Biología del salivazo *Prosapia simulans*: (Homóptera: Cercopidae), nueva plaga de gramíneas cultivadas en Colombia. Centro internacional de agricultura tropical (CIAT). Revista Colombiana de Entomología. 29 (2): 149-150.
- Rondon, M. R., August, P. R., Betterman, A. D., Brady, S. F., Grossman, T. H., Liles, M. R Loiacono, K. A., Lynch, B. A., MacNeil, I. A., Minor, C., Tiong, C. L., Gilman, M., Osburne, M. S., Clardy, J., Handelsman, J., y Goodman, R. M. 2000.** Cloning the soil metagenome: A strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms, *Applied Environmental Microbiology*, vol. 66, pp. 2541–2547.
- Rosero Guerrero, M. 2011.** Evaluación de la virulencia de nematodos entomopatógenos para el control del salivazo de la caña de azúcar, *Aeneolamia varia* (F) (Hemiptera: Cercopidae). Tesis Magister en Ciencias Agrarias, énfasis protección de cultivos. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Escuela de Posgrados. Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira. Cenicaña. 80 pp.
- Salazar, J. y Proaño, L. 1989.** Pérdidas ocasionadas por la candelilla de la caña de azúcar (*Aeneolamia varia*) en el área de influencia del central Río Turbio: Estudio comparativo de las zafras 84/85 y 85/86. Caña de Azúcar, Vol. 7(2): 49-54.
- SAGARPA, SIAP, COLPOS. 2009.** Digitalización del Campo Cañero en México para Alcanzar la Agricultura de Precisión de la Caña de Azúcar. Desarrollo de un Modelo Integral de Sistema de Información Geográfica y Edáfica como Fundamento de la Agricultura de Precisión en la Caña de Azúcar en

- México. Resumen: Ingenio Potrero, Constanca y Motzorongo Etapa I. pp. 1-9.
- Savario, F. C., 2003.** A comparison of microbial communities in soil with and without a sugarcane cropping history. Louisiana State University. Thesis Master of Science. pp. 1-28.
- Servicio de información Agroalimentaria y Pesquera.** SIAP 2012. <http://www.siap.gob.mx/>.
- Smits, P. 1996.** Post-application persistence of entomopathogenic nematodes. *Biocontrol Science and Technology*, 6: 379–387.
- Simons, W. R. y Poinar, G. O., Jr. 1973.** The ability of *Neoplectana carpocapsae* (Steinernematidae: Nematoda) to survive extended periods of desiccation. *Journal Invertebrate Pathology*. 22, 228-230.
- Simons, N. y Rosa, J. S. 1996.** Pathogenicity and host specificity of entomopathogenic nematodes. *Biocontrol Sci. Technol.* 6:403-411.
- Siddiqui, Z. A. 2005.** PGPR: Prospective biocontrol agents of plant pathogens. En: Siddiqui, Z.A. (ed) PGPR: Biocontrol and Fertilization. pp 111-142.
- Stanley Y.** 1994. The Family Streptomycetaceae. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore USA: USA: Ed. Wilkins. Vol. 4. 605-669.
- Tate RL. 2000.** *Soil Microbiology* (second ed.), Wiley. New York, pp 47-56.
- Tokala K. Strap C, Jung D, Crawford L. Salove L. Deob Deobald J. Morra J.** 2002. Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Applied and Environmental Microbiology* 68:2161-2171.
- Torriello C, Montoya-Sanson E, Zavala-Ramírez M, Navarro-Barranco H, Basilio-Hernández D, Hernández-Velásquez V & Mier T (2008).** Virulencia y termotolerancia de cultivos monoespóricos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* de la mosca pinta (Hemiptera: Cercopidae). *Rev. Mex. Micol.* 28: 57-66.
- Valério, J.R. 1988.** Spittlebugs: important pasture pests in Brazil. *Tymbal* 12: 14-16.
- Valerio, J. R., C. Cardona, D. C. Peck, and G. Sotelo. 2001.** Spittlebugs: bioecology, host plant resistance and advances in IPM. En: *Proceedings of*

the 19th International Grass Congress, 11-21 February 2001, Sao Pedro, Sao Paulo, Brazil. CENARGEN, EMBRAPA, Brasilia. pp: 217-221.

Von Brand, T. 1943. Physiological observations upon a larval Eustrongylides IV. Influence of temperature, pH and inorganic ions upon the oxygen consumption Biol. Bull. 84:148-156.

Woodring, J. L. Y Kaya H. K. 1988. *Steinernematid and Heterorhabditid* nematodes: A handbook of techniques. Southern Cooperative Series Bulletin No. 331. Aransas Agricultural Experimental Station Fayetteville, Arkansas. 30p.

Whittaker, B. J. 1970. Cercopid spittle as a microhabitat. Department of Biological Sciences, University of Lancaste. Copenhagen. OIKOS 21: 59-64.

Zambrano C, Sosa MA, de Sepúlveda M, Molina N, Zambrano E & Sánchez EJ (1989). Los cañicultores se incorporan al uso de microorganismos contra insectos plagas. Venezuela Azucarera 29: 4-7.

Zimmermann, G. 1986. The Galleria bait method for detection of entomopathogenic fungi in soil. J. Appl. Entomol. 102, 213-215.

ANEXO 1.

Cría de *G. mellonella*

La cría se mantiene en el Colegio de Postgraduados en el laboratorio de Patología de Insectos. (1988). Se inició a partir de 0.02 gr. de huevos, mismos que se depositaron en vasos pequeños con dieta compuesta; en proporción para 1 kilogramo, por salvado de trigo (700 gr), harina de maíz (300 gr), levadura desamargada (70 gr) y miel de abeja (400 gr). Posteriormente, las larvas (de pre dietas) con aproximadamente 1 cm de largo fueron transferidas a recipientes de plástico de 500 gr. con dieta artificial. Cabe mencionar que todo el proceso de cría se realizó a 30 °C. Las larvas fueron seleccionadas en el último instar de desarrollo y estas fueron utilizadas durante la presente investigación. La cría de la polilla de la cera se realizó con el objetivo de aislar y multiplicar nematodos entomopatógenos que pudieran encontrarse en las muestras de suelo y además como indicadoras de presencia ó ausencia de nematodos entomopatógenos durante el ensayo. Woodring y Kaya (1988).