



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Evaluación *in vitro* de la patogenicidad del
nematodo entomopatógeno *Rhabditis regina* en
diferentes especies de insectos

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

LUIS ANGEL JIMÉNEZ SANTIAGO



DIRECTOR DE TESIS:
DR. VÍCTOR LÓPEZ GÓMEZ
CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX. 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Jiménez
Santiago
Luis Angel
5566152185
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
309290557

2. Datos del tutor

Dr.
Víctor
López
Gómez

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Hugo Harlan
Mejía
Madrid

4. Datos del sinodal 2

M. en C.
Iván Israel
Castellanos
Vargas

5. Datos del sinodal 3

Dra.
Mónica Elisa
Queijeiro
Bolaños

6. Datos del sinodal 4

M. en B.
Gabriela Selene
Ortiz
Burgos

7. Datos de la tesis

Evaluación *in vitro* de la patogenicidad del nematodo entomopatógeno *Rhabditis regina* en diferentes especies de insectos
58 p.
2018

El presente estudio formó parte del proyecto de investigación “Generación de nuevas estrategias de monitoreo y control de los insectos descortezadores *Dendroctonus mexicanus*, *Dendroctonus frontalis* e *Ips lecontei*, mediante el uso de semioquímicos y entomopatógenos”, el cual se realizó en el Laboratorio de Sanidad Forestal del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Conservación y Mejoramiento de Ecosistemas Forestales del Instituto de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).



“La ciencia a pesar de sus progresos increíbles, no puede ni podrá nunca explicarlo todo. Cada vez ganará nuevas zonas a lo que hoy parece inexplicable. Pero las rayas fronterizas del saber, por muy lejos que se eleven, tendrán siempre delante un infinito mundo de misterio”.

Gregorio Marañón

DEDICATORIA

A MI MAMA

Por darme la vida, cuidarme, educarme y darme los mejores consejos en los momentos de incertidumbre. También por alegrarme la vida, eres la persona más linda y sin tu apoyo no hubiera logrado concluir esta fase satisfactoriamente. Te amo infinitamente mamá.

A MI HERMANA

Por su compañía, consejos, entusiasmo, y por enseñarme a alcanzar mis metas. Te amo hermanita.

A MI PAPA

Por cuidarme y apoyarme a concluir esta fase de mi vida.

A MI CADENA COMPLEMENTARIA

Por ser mi otra parte y compartir esos bellos momentos.

Son una gran cantidad de personas que les agradezco por formar parte de mi vida profesional y personal, algunas están compartiendo el camino conmigo y otras estarán en mis recuerdos para siempre.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría comenzar agradeciendo al Dr. Víctor López Gómez por aceptar desde un inicio ser mi tutor, brindarme su amistad, transmitirme sus conocimientos de una forma divertida, tenerme demasiada paciencia y por su determinación para que este trabajo finalizara.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme tener la agradable experiencia de ser universitario.

Al INIFAP, por el financiamiento para la realización de esta investigación.

Al taller de “Ecología terrestre y manejo de recursos bióticos” de la Facultad de Ciencias, UNAM, por el asesoramiento de los profesores que contribuyeron a darle forma a esta tesis.

A la Biól. Rebeca Hernández Peña por su apoyo en la realización de los resultados, por su ayuda en la colecta de insectos en la calurosa REPSA.

A la Biól. Mariana por su ayuda en los experimentos y aquellas largas tardes que pasamos en el laboratorio encontrando las técnicas adecuadas.

Al Biól. José Lizarde Sandoval por enseñarme una gran cantidad de métodos y técnicas en laboratorio, además de presentarme una perspectiva diferente acerca de la enseñanza de la Biología.

A mis amigos Jesús, Mariela, Emiliano, Iván, Mario, Laura, Monserrat por todos los buenos momentos que compartimos.

A los miembros del jurado: Dr. Hugo Harlan Mejía Madrid, M. en C Iván Israel Castellanos Vargas, Dra. Mónica Elisa Queijeiro Bolaños, M. en B. Gabriela Selene Ortiz Burgos que me apoyaron en la revisión de la tesis.

CONTENIDO

RESUMEN	1
I.INTRODUCCIÓN	2
1.1. Insectos plaga.....	2
1.2. Control de insectos plaga.....	2
1.2.1. <i>Control biológico</i>	3
1.3. Nematodos.....	5
1.3.1. <i>Nematodos entomopatógenos</i>	5
1.3.2. <i>Factores abióticos y bióticos sobre los nematodos entomopatógenos</i>	6
1.3.3. <i>Implicaciones en el uso de nematodos entomopatógenos</i>	7
1.3.4. <i>Ámbito de hospederos</i>	7
1.4. El nematodo entomopatógeno <i>Rhabditis regina</i>	8
1.4.1. <i>Ciclo biológico</i>	9
1.4.2. <i>Bacterias entomopatógenas</i>	9
II.JUSTIFICACIÓN	11
III.OBJETIVOS E HIPÓTESIS	12
IV.MATERIAL Y MÉTODOS	13
4.1. Sitio de estudio.....	13
4.2. Métodos.....	14
4.2.1. <i>Colecta de muestras de suelo</i>	14
4.2.2. <i>Aislamiento de nematodos entomopatógenos</i>	14
4.2.3. <i>Reinfección por nematodos entomopatógenos</i>	16
4.2.4. <i>Montajes temporales e identificación</i>	16
4.2.5. <i>Medio de cultivo</i>	17
4.3. Obtención de insectos hospederos.....	17
4.3.1. <i>Colecta de escarabajos descortezadores y avispas</i>	17
4.3.2. <i>Colecta de chapulines y chinches</i>	19
4.3.3. <i>Cría del gusano de cera y el gusano de harina</i>	19
4.4. Pruebas de patogenicidad.....	20
4.4.1. <i>Desinfección de insectos</i>	20

4.4.2. Extracción de nematodos del medio de cultivo y preparación de concentraciones.....	20
4.4.3. Bioensayo.....	21
4.5. Análisis estadístico.....	22
V. RESULTADOS.....	23
5.1. Pruebas de patogenicidad <i>in vitro</i>	23
5.1.1. Mortalidad en <i>G. mellonella</i>	23
5.1.2. Mortalidad en <i>T. molitor</i> , <i>Ips sp.</i> y <i>Dendroctonus sp</i>	25
5.1.3. Mortalidad en <i>S. purpurascens</i>	30
5.1.3. Mortalidad en <i>Polistes sp.</i>	31
5.1.4. Mortalidad en <i>P. indecorus</i>	33
VI.DISCUSIÓN.....	35
6.1.1. Mortalidad en los insectos.....	35
6.1.1. Larvas <i>G. mellonella</i> y <i>T. molitor</i>	35
6.1.2. Escarabajos descortezadores.....	36
6.1.3. El chapulín <i>S. purpurascens</i>	38
6.1.4. La avispa <i>Polistes sp.</i>	38
6.1.5. La chinche <i>P. indecorus</i>	39
6.2. Elementos condicionantes la infección de <i>R. regina</i>	40
6.3. Ventajas y desventajas del uso de nematodos entomopatógenos.....	41
6.4. <i>R. regina</i> como agente de control biológico de plagas de insectos.....	42
VII. CONCLUSIONES.....	44
LITERATURA CITADA.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de la ubicación del municipio San José Gracia en el estado de Aguascalientes.....	13
Figura 2. (A) Colecta de suelo con una pala. (B) Suelo mezclado homogéneamente.....	14
Figura 3. (A) Tamizado del suelo. (B) Suelo húmedo al 85%. (C) <i>G. mellonella</i> en infección con el suelo. (D) Vasos de suelo con <i>G. mellonella</i> rodeados de vermiculita para mantener la humedad.....	15
Figura 4. Recolección de juveniles infectivos <i>J1</i> en cámaras blancas.....	16
Figura 5. (A) Medio de cultivo después de la inoculación. (B) Acercamiento del medio de cultivo después de una semana de inoculación.....	17
Figura 6. Pino descortezado.....	18
Figura 7. Recolección de avispas de la trampa Lindgren.....	18
Figura 8. (A) Dieta artificial para <i>G. mellonella</i> . (B) Jaula para la ovoposición de los adultos de <i>G. mellonella</i>	19
Figura 9. Dieta para la cría de <i>Tenebrio molitor</i>	20
Figura 10. Porcentaje de mortalidad de la larva de cera <i>G. mellonella</i> inoculados con cuatro concentraciones (100, 200, 400 y 800) del nematodo entomopatógeno <i>R. regina</i> ; en los promedios que comparten letras no hay diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($P < 0.05$).....	24
Figura 11. (A) Larva de <i>G. mellonella</i> . (B) Transcurridos 7 días, los nematodos entomopatógenos acabaron con el 90% del cuerpo de la larva.....	24
Figura 12. Porcentaje de mortalidad del gusano de harina <i>T. molitor</i> inoculados con cuatro concentraciones (100, 200, 400 y 800) del nematodo entomopatógeno <i>R. regina</i> ; en los promedios que comparten letras no hay diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($P < 0.05$)	26
Figura 13. (A) Larva de <i>T. molitor</i> . (B) Emergencia de nematodos en la parte anterior de la larva de <i>T. molitor</i>	26
Figura 14. Porcentaje de mortalidad del escarabajo descortezador <i>Dendroctonus</i> sp. inoculados con cuatro concentraciones (100, 200, 400 y 800) del nematodo	

entomopatógeno *R. regina*; en los promedios que comparten letras no hay diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($P < 0.05$)27

Figura 15. (A) Escarabajo adulto de *Dendroctonus* sp. (B) Emergencia de nematodos entomopatógenos *R. regina* del tórax del escarabajo.....28

Figura 16. Porcentaje de mortalidad del escarabajo descortezador *Ips* sp. inoculados con cuatro concentraciones (100, 200, 400 y 800) del nematodo entomopatógeno *R. regina*; en los promedios que comparten letras no hay diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($P < 0.05$).....29

Figura 17. (A) Escarabajo adulto de *Ips* sp. (B) Emergencia de nematodos entomopatógenos *R. regina* de la parte anterior del abdomen.....29

Figura 18. Porcentaje de mortalidad del chapulín *S. purpurascens*, inoculados con cuatro concentraciones (100, 200, 400 y 800) de nematodos entomopatógenos *R. regina*; en los promedios que comparten letras no hay diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($P < 0.05$).....30

Figura 19. (A) Chapulín adulto de *S. purpurascens*. (B) Emergencia de nematodos en el abdomen. (C) Coloración rojiza de *S. purpurascens* debido al ataque de *R. regina*. (D) Ingreso de nematodos al ojo de *S. purpurascens*.....31

Figura 20. Porcentaje de mortalidad de la avispa *Polistes* sp. inoculados con cuatro concentraciones (100, 200, 400 y 800) del nematodo entomopatógeno *R. regina*; en los promedios que comparten letras no hay diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($P < 0.05$).....32

Figura 21. (A) Adulto de *Polistes* sp. (B) Emergencia de nematodos *R. regina* de la cabeza y el tórax.....32

Figura 22. Porcentaje de mortalidad de la chinche *P. indecorus*, inoculados con cuatro concentraciones (100, 200, 400 y 800) del nematodo entomopatógeno *R. regina*; en los promedios que comparten letras no hay diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Tukey ($P < 0.05$).....33

Figura 23. A) Chinche adulta de *P. indecorus*. B) Coloración rojiza de *P. indecorus* debido al ataque de *R. regina*.C) Emergencia de nematodos del torax. D) Emergencia de nematodos del abdomen.....34

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Descripción de los tratamientos de patogenicidad de <i>Rhabditis regina</i> sobre cada uno de los insectos.....	21
Cuadro 2. Resultados del GLM (distribución de error tipo binomial y función logit) para probar el efecto del tiempo transcurrido, concentración de nematodos entomopatógenos y su interacción (tiempo × concentración) sobre la mortalidad acumulada del lepidóptero en <i>G. mellonella</i>	23
Cuadro 3. Resultados del GLM (distribución de error tipo binomial y función logit) para probar el efecto del tiempo transcurrido, concentración de nematodos entomopatógenos y su interacción (tiempo × concentración) sobre la mortalidad acumulada de <i>T. molitor</i>	25
Cuadro 4. Resultados del GLM (distribución de error tipo binomial y función logit) para probar el efecto del tiempo transcurrido, concentración de nematodos entomopatógenos y su interacción (tiempo × concentración) sobre la mortalidad acumulada del escarabajo <i>Dendroctonus</i> sp.....	27
Cuadro 5. Resultados del GLM (distribución de error tipo binomial y función logit) para probar el efecto del tiempo transcurrido, concentración de nematodos entomopatógenos y su interacción (tiempo × concentración) sobre la mortalidad acumulada del escarabajo <i>Ips</i> sp.....	28
Cuadro 6. Resultados del GLM (distribución de error tipo binomial y función logit) para probar el efecto del tiempo transcurrido, concentración de nematodos entomopatógenos y su interacción (tiempo × concentración) sobre la mortalidad acumulada del chapulín <i>S. purpurascens</i>	30
Cuadro 7. Resultados del GLM (distribución de error tipo binomial y función logit) para probar el efecto del tiempo transcurrido, concentración de nematodos entomopatógenos y su interacción (tiempo × concentración) sobre la mortalidad acumulada de la avispa <i>Polistes</i> sp.....	31
Cuadro 8. Resultados del GLM (distribución de error tipo binomial y función logit) para probar el efecto del tiempo transcurrido, concentración de nematodos entomopatógenos y su interacción (tiempo × concentración) sobre la mortalidad acumulada de la chinche <i>P. indecorus</i>	33

Jiménez, S. L. A. 2018. Evaluación *in vitro* de la patogenicidad del nematodo entomopatógeno *Rhabditis regina* en diferentes especies de insectos. Tesis Profesional, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 58 p.

RESUMEN

Los nematodos entomopatógenos han sido utilizados como eficientes agentes de control de insectos plaga. El objetivo de este trabajo fue determinar las concentraciones que ocasionan una mayor virulencia por parte de *Rhabditis regina* (100, 200, 400 y 800 nematodos/insecto, n/i) sobre: *Galleria mellonella*, *Tenebrio molitor*, *Ips* sp., *Dendroctonus* sp., *Sphenarium purpurascens*, *Piezogaster indecorus* y *Polistes* sp., evaluando el número de días que tardó *Rhabditis regina* en provocar la mortalidad total en sus hospederos. Primero se aisló el nematodo entomopatógeno del bosque de pino de Sierra Fría, Aguascalientes. Se realizaron bioensayos en laboratorio utilizando cuatro tratamientos y un control, cuyas concentraciones fueron de 800, 400, 200, 100 y 0 nematodos/insecto. Cada tratamiento tuvo cuatro repeticiones, se registró durante ocho días consecutivos el número de individuos muertos por caja Petri. Se determinó que *R. regina* provocó el 100% de mortalidad con las concentraciones más altas 800, 400 y 200 n/i en casi todos los insectos, excepto para *P. indecorus* que con ninguna concentración alcanzó la mortalidad total. Además, se registró que con la concentración de 100 n/i, el tiempo para alcanzar la mortalidad total fue mayor e inclusive para *T. molitor* y en el caso de *S. purpurascens* no se presentó, mientras que el tratamiento control no alcanzó la mortalidad total en ninguna especie de insecto. Se observó un efecto significativo de la concentración de nematodos, el tiempo transcurrido y la interacción de los factores antes mencionados (concentraciones de nematodos × tiempo) sobre la mortalidad acumulada de *G. mellonella*, *T. molitor*, *Dendroctonus* sp., *Ips* sp., *S. purpurascens*, y *Polistes* sp. Para *P. indecorus* se observó un efecto significativo de la concentración de nematodos, el tiempo transcurrido, pero en comparación con las demás especies de insectos no presentó un efecto significativo en la interacción de estos factores. Se concluye que el nematodo *R. regina* tiene potencial para usarse en el control biológico de las siete especies de insectos.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Insectos plaga

El concepto de plaga tiene un sentido antropocéntrico y se aplica a cualquier organismo que produce un daño o reduce la disponibilidad y calidad de un recurso de uso humano (Rey, 1976). Los recursos abarcan plantas y animales destinados a fines alimenticios o provisión de materias primas, que incluso pueden repercutir en la salud humana (Hajek, 2004).

Entre los organismos que pueden volverse plaga se encuentran los insectos. Los insectos se adaptaron para sobrevivir a pesar de los cambios hechos por el hombre o de los cambios ecológicos naturales (Gatehouse *et al.*, 1992). Los insectos plagas causan daños relacionados con la muerte de las semillas y plántulas, escaso desarrollo de las raíces y partes aéreas, alteraciones morfológicas y fisiológicas, marchitez, debilitamiento y favorecen el acceso de fitopatógenos (Ríos-Rosillo y Romero-Parra, 1982).

Los principales órdenes de insectos considerados plaga, son: Orthoptera, Thysanoptera, Hemiptera, Homoptera, Coleoptera, Hymenoptera, Diptera y Lepidoptera. Las especies de insectos plaga pueden causar daños a las plantas en su fase de larva, adulta o en presencia de ambas fases (Selfa y Anento, 1997).

Los insectos que son considerados plaga están distribuidos en varios grupos según su estrategia de alimentación, como son: minadores, que perforan el tallo continuando su alimentación dentro de la planta; succionadores, que se alimentan de los fluidos vegetales; masticadores, que se alimentan trozando las raíces; y descortezadores de árboles (Coto *et al.*, 1995).

1.2. Control de insectos plaga

El control de plagas se refiere a cualquier método que pueda dar lugar a la reducción de daños causados por ellas (Romanyk y Kadahia, 2002). Los objetivos del manejo y control de plagas de insectos es establecer y mantener condiciones, que impidan que los insectos provoquen problemas de importancia económica. Esto se logra evitando que se establezcan o que se diseminen, mediante la prevención o el control

de las infestaciones a un nivel que sea el mínimo posible, evitando afectar a otros seres vivos (Behle *et al.*, 1997).

En el control de plagas de insectos se utiliza intensamente insecticidas químicos porque tienen rápida acción, facilidad de aplicación, manejo y relativamente una larga vida útil. Sin embargo, el uso indiscriminado de estos insecticidas ha ocasionado severos problemas de contaminación ambiental, como son: impacto negativo sobre la vida silvestre (i.e. polinizadores, enemigos naturales y peces), calidad de agua y suelo; también han favorecido al desarrollo de organismos altamente resistentes (Batra, 1982). Además, afectan de forma negativa la salud humana (Pimentel y Lehman, 1993). Debido a lo anterior se buscan alternativas para evitar estos efectos negativos expuestos, como puede ser el control biológico.

1.2.1. Control biológico. Es un sistema de manejo de plagas que utiliza técnicas y métodos apropiados para mantener poblaciones nocivas en niveles bajos. Se coordinan diversas técnicas con elementos naturales, reguladores y limitadores de las poblaciones existentes (Romanyk y Kadhia, 2002).

Para el control biológico de invertebrados comúnmente se utilizan enemigos naturales, los cuales se clasifican en cuatro categorías: depredadores, parasitoides, competidores y patógenos. Estos agentes de control provienen de una gran variedad de grupos taxonómicos, incluyendo a los insectos, ácaros y microorganismos. Estos agentes de control, al pertenecer a distintos grupos poseen diferentes características biológicas (Bale *et al.*, 2008).

Las interacciones entre especies pueden generar procesos ecológicos y evolutivos que, en contextos geográficos y temporales, pueden causar la supervivencia o extinción de las especies (Connell, 1983). En el control biológico, una de las interacciones fundamentales es la depredación la cual consiste en el consumo de un organismo llamado presa por parte de un depredador. La depredación es la transferencia de energía de un nivel trófico a otro nivel superior, e indica una interacción compleja entre dos o más especies (Badii *et al.*, 2007).

La patogenicidad se refiere a la habilidad de un organismo de producir enfermedad, en algunas ocasiones se expresa como una habilidad genéticamente determinada (Nicholls, 2008) y la virulencia es la capacidad relativa de un organismo de causar daño en un hospedero (Casadevall y Pirofski, 1999). Los patógenos son microorganismos parásitos, dentro de los cuales encontramos: virus, bacterias, hongos, nematodos y protozoos. Estos microorganismos generalmente invaden y se multiplican en el hospedero y se dispersan infectando otros hospederos (Nicholls, 2008).

La interacción entre la plaga y el enemigo natural implica una supresión de tipo denso-dependiente que provoca el mantenimiento de ambas poblaciones en equilibrio. Es decir, la interacción de poblaciones significa una regulación (Summy y French, 1988).

El control biológico tiene diversas ventajas, como son: escasos o ningún efecto nocivo al ambiente, raros casos de resistencia, regulación de la plaga a largo plazo, puede eliminar por completo o parcialmente el uso de insecticidas, evita plagas secundarias y no provoca intoxicaciones (Summy y Frech, 1988). Entre las desventajas encontramos: poco conocimiento sobre los principios del método, reducido apoyo económico, escaso personal especializado, dificultad para aplicarlo en complejos de plagas, además que los enemigos naturales se incrementan con retraso en comparación a las plagas que atacan, por lo cual, no proveen la supresión inmediata que se obtiene con los insecticidas y los resultados del control biológico no son tan espectaculares en el corto plazo como los insecticidas (Summy y Frech, 1988). La falta de conocimiento de la biología del enemigo natural y su falta de evaluación antes de su introducción en el campo podría provocar la extinción de especies, como fue el caso de la extinción palomilla del cocotero, *Levuana iridescens* Bethune-Baker por la introducción en 1925 del taquínido *Bessa remota* (Aldrich) en Fiji (Kuris 2003). Pese a estas desventajas, el control biológico debe emplearse con mayor frecuencia como parte del manejo de plagas ya que constantemente se incrementa la resistencia a los insecticidas químicos (Summy y French, 1988).

En los países en desarrollo, donde es altamente elevado el costo de los insecticidas y muy frecuente la resistencia de las plagas a los insecticidas, el control biológico tiene una aplicación esencial que todavía no ha sido ampliamente explorado (Grethead y Waage, 1983).

1.3. Nematodos

El Phylum Nematoda es uno de los más diversos del reino animal con un número estimado de más de 500,000 especies (Baldwin *et al.*, 2000). Los nematodos han evolucionado para vivir en diferentes ecosistemas como fitoparásitos, depredadores, parasitoides y de vida libre, donde se encargan de la descomposición de la materia orgánica (Lara *et al.*, 2003).

Los nematodos están presentes en el mar, en aguas dulces y en el suelo; se distribuyen desde regiones polares hasta los trópicos especialmente, donde existe alta descomposición de materia orgánica. La alimentación de los nematodos de vida libre consta de bacterias, levaduras, hifas de hongos y algas; las variedades depredadoras pueden alimentarse de insectos en estado adulto y larvas. Los de vida libre miden menos de 2.5 mm de largo en promedio, encontrándose otros microscópicos que en promedio miden 0.5 mm (Lara *et al.*, 2003).

1.3.1. Nematodos entomopatógenos. Las relaciones simbióticas entre nematodos e insectos son muy amplias, abarcando desde el comensalismo hasta el parasitismo. En las relaciones parásitas, los nematodos entomoparásitos pueden ser obligados o facultativos y utilizar al insecto como hospedero intermedio o definitivo (Kaya y Gaugler, 1993).

Dentro de esta asociación parásita entre nematodos e insectos, diferenciamos a aquellos nematodos propiamente parásitos, que viven y se alimentan a expensas de su hospedero, produciendo diversos daños en el insecto y eventualmente provocando la muerte. En cambio, los nematodos entomopatógenos presentan una relación simbiótica con microorganismos que generan una rápida septicemia, es decir una infección causada por la invasión y

multiplicación de microorganismos en la hemolinfa del insecto, este último grupo teniendo un considerable potencial como bioinsecticidas (Kaya, 1993).

Los nematodos entomopatógenos se reproducen en el cadáver del insecto y se alimentan de la biomasa bacteriana y de los tejidos del insecto metabolizados por la bacteria (Boemare, 2002). La reproducción del nematodo continua hasta que la reserva de alimento que proporciona el hospedero es suficiente para continuar con un nuevo ciclo (Adams y Nguyen, 2002).

Las familias de nematodos entomopatógenos que han sido estudiadas son; Rhabditidae, Tetradonematidae, Mermithidae, Allantonematidae, Neotylenchidae, Sphaerularidae, Aphelenchidae, Heterorhabditidae y Steinernematidae (De Ley y Blaxter, 2002).

1.3.2. Factores abióticos y bióticos sobre los nematodos entomopatógenos. La supervivencia y eficacia de los nematodos entomopatógenos varían frente a los factores abióticos. Por ejemplo, los nematodos se pueden desempeñar dentro de un amplio rango de temperatura (de 3 a 35°C) (Patel *et al.*, 1997).

La humedad extrema afecta su establecimiento, mientras que el desecamiento dificulta su movilidad y capacidad de búsqueda del hospedero, generando condiciones anaerobias que reducen su viabilidad (Ishibashi y Kondo, 1990; Koppenhöfer y Kaya, 1997).

Los nematodos entomopatógenos se dispersan mediante la lluvia, viento, suelo o por medio de los humanos e insectos (Kaya, 1990; Nguyen y Smart, 1990). Sin embargo, su potencial para dispersarse está limitado a metros por año (Poinar y Hom, 1986). Las dispersiones a largas distancias requieren ser transportados por los insectos hospederos (Parkman y Smart, 1996).

En el campo, algunos organismos como hongos, bacterias, virus, protozoos y ácaros pueden llegar a ser antagonistas de estos nematodos entomopatógenos, ya que pueden actuar como depredadores o causantes de enfermedades (Kaya, 1990; Kaya y Koppenhöfer, 1996).

1.3.3. *Implicaciones del uso de nematodos entomopatógenos.* En la década de 1930 comenzaron los primeros programas que emplearon nematodos entomopatógenos contra el escarabajo japonés *Popillia japonica* y han sido ampliamente utilizados en el ámbito agrícola (Glaser,1932).

El uso de nematodos entomopatógenos tiene varios atributos dentro de los cuales podemos mencionar que no provocan toxicidad significativa para vertebrados; se han realizado pruebas con las bacterias *Xenorhabdus* spp., que tienen asociación simbiótica con el género de nematodos entomopatógenos *Steinernema*, y la bacteria *Photorhabdus* spp., que tiene asociación con el género *Heterorhabditis*, para evaluar los efectos de patogenicidad sobre vertebrados, y las pruebas han indicado que no representan ningún peligro (Boemare *et al.*, 1996). Además, no tienen importantes repercusiones a largo plazo en poblaciones de invertebrados no blanco. No obstante, se indica que insectos como parasitoides y polinizadores pueden ser susceptibles, al menos en algún momento del ciclo de vida; pero, a pesar de esta implicación, el beneficio del uso de nematodos entomopatógenos es mayor (Lemire *et al.*1996).

Sin embargo, el empleo de nematodos entomopatógenos requiere de medidas preventivas que deben ser tomadas durante las fases de producción y aplicación para evitar causar daños al ambiente, como son: realizar pruebas que demuestren que son inocuos para los humanos, determinar el ámbito de hospederos antes de su liberación, así como el monitoreo del comportamiento entre el nematodo entomopatógeno y la plaga (Akhurst y Smith, 2002).

En contraste con los nematodos entomopatógenos, los insecticidas químicos no se pueden desplazar por el agua o suelo y tienden a decaer en unos días. Los nematodos entomopatógenos son móviles y persistentes, ellos se reciclan dentro del insecto hospedero, manteniendo así su efecto a largo plazo (Selcuk *et al.*, 2001).

1.3.4. *Ámbito de hospederos.* En la naturaleza, el rango de hospederos de los nematodos entomopatógenos es limitado y restringido principalmente por las barreras ecológicas y el modo de infección de los nematodos sobre sus hospederos (Gaugler,1988). Sin embargo, puede llegar a registrarse una gran cantidad de

hospederos potenciales. Por ejemplo, se conoce que *Steinernema carpocapsae* infecta alrededor de 250 especies de insectos (Poinar, 1979), y a cuatro órdenes de insectos (Coleoptera, Hymenoptera, Diptera y Lepidoptera); en comparación, *Steinernema feltiae* se ha encontrado infectando a los órdenes Coleoptera y Lepidoptera (Peters, 1996).

La especie *Heterorhabditis bacteriophora* ataca a los órdenes Blattaria, Orthoptera, Isoptera, Thysanoptera, Homoptera, Hemiptera, Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera y Diptera (Doucet y Gabarra, 1994).

Otros grupos de invertebrados que también son susceptibles a la infección por nematodos heterorhabditidos y steirnamatidos, son algunos gasterópodos, miriápodos, arácnidos, crustáceos y diplópodos (Poinar, 1989).

Aunque el ámbito de hospederos de los nematodos entomopatógenos incluye una gran cantidad de especies de insectos, los nematodos entomopatógenos que han sido comercializados solo cubren una pequeña fracción para el control biológico de insectos. Existe un gran interés en aislar nematodos de diferentes regiones del mundo para ser usados como agentes de control biológico en plagas de dichas regiones (Didem *et al.*, 2006). Los nematodos nativos estarían mejor adaptados climáticamente al igual que la plaga y se evitaría la introducción de nematodos entomopatógenos exóticos en la región. Por esta razón, los muestreos en muchas partes del mundo se han llevado a cabo para levantar un inventario de los nematodos entomopatógenos presentes, los cuales serían más adecuados para un control biológico en sus respectivas regiones (Didem *et al.*, 2006).

1.4. El nematodo entomopatógeno *Rhabditis regina*

El género *Rhabditis* agrupa a un conjunto de especies de nematodos depredadores, sus hábitos alimenticios comprenden una gran variedad de hongos y bacterias fitopatógenas que habitan en el suelo, así como de algunos insectos que parasitan el intestino de otros insectos; además tienen una gran importancia agrícola porque contribuyen en el ciclaje de la materia orgánica. Es un género de vida libre y la mayoría de las especies miden pocos micrómetros (Cepeda, 1996).

La distribución de la especie *R. regina* solo se ha reportado en Guatemala y México (Schulte y Poinar, 1991; Jiménez *et al.*, 2016).

1.4.1. Ciclo biológico. El nematodo entomopatógeno *R. regina* presenta un ciclo de vida basado principalmente en seis estados de desarrollo: huevo, cuatro estadios juveniles, conocidos también como dauer y adulto (Wouts, 1991). Los machos alcanzan la fase adulta en 24 h y las hembras en 30 h; en la copula el macho dobla el extremo de la cola alrededor de la hembra para encontrar la región vulvar, y posteriormente deposita una gran cantidad de espermatozoides en el receptáculo seminal de la hembra. Los huevos se desarrollan en el interior de la hembra y los juveniles después de cuatro días eclosionan en el útero, lo que provoca la muerte de la madre, proceso denominado endotoquia matricida (Schulte y Poinar, 1991).

1.4.2. Bacterias entomopatógenas. El nematodo *R. regina* tiene asociaciones con varios géneros de bacterias, como: *Alcaligenes*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Enterococcus* y *Bacillus*, que les permite sobrevivir en diferentes condiciones (Tambong, 2013). Los nematodos introducen las bacterias en la cavidad del insecto, las bacterias destruyen los tejidos internos del insecto y propician un medio favorable para la alimentación y reproducción del nematodo (Rosales *et al.*, 1999).

La bacteria *Serratia marcescens* tiene alta capacidad quitinolítica (Brurberg *et al.*, 1996). Las enzimas quitinasas producidas por *S. marcescens* degradan la cutícula de quitina de los insectos (Ordentlichy *et al.*, 1988). La bacteria *S. marcescens* provoca la muerte en gusanos cortadores de la familia de la Noctuidae (Nishiwaki *et al.*, 2007).

El nematodo *R. regina* tiene un estilo de vida complejo, fluctuando entre la vida libre alimentándose de bacterias del suelo, o con hábitos necroménicos los cuales consisten en la adquisición de bacterias de insectos muertos o también puede tener características de nematodo entomopatógeno ya que infecta activamente a sus hospederos principalmente con las bacterias *Klebsiella* sp. y *Serratia* sp. (Li *et al.*, 2015). Esta plasticidad puede explicar por qué *R. regina* es

capaz de persistir en el suelo durante largos períodos de tiempo y en condiciones adversas (Stasiuk *et al.*, 2012). Parece posible que los atributos mencionados convierten a este nematodo como un eficiente controlador biológico en el campo. Aunque las bacterias que contribuyen a la muerte de insectos pueden perderse en condiciones de laboratorio, lo que representa una desventaja cuando se cultiva al nematodo *R. regina* para ser utilizado como controlador biológico (Jiménez *et al.*, 2016).

II. JUSTIFICACIÓN

Los nematodos entomopatógenos pueden poseer un alto grado de patogenicidad sobre insectos plaga, tienen un crecimiento poblacional elevado, lo cual es indispensables para su producción masiva y su aplicación, además tienen una alta capacidad de búsqueda (particularmente a bajas densidades de la plaga); por lo que el uso de nematodos entomopatógenos puede resultar en un control biológico eficaz a largo plazo y eliminar por completo o sustancialmente el uso de insecticidas químicos (Bale *et al.*, 2011).

Debido a lo anterior, son necesarios estudios de evaluación *in vitro* con nematodos entomopatógenos para determinar sus niveles de patogenicidad en diferentes hospederos evitando posibles efectos negativos en insectos no blanco, además de encontrar cepas de nematodos entomopatógenos con un buen desempeño en el campo.

III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

El objetivo general de este trabajo es determinar la patogenicidad del nematodo entomopatógeno *Rhabditis regina* en siete especies de insectos bajo condiciones de laboratorio.

Los objetivos particulares, por su parte, son los siguientes:

- Determinar la concentración que ocasiona una mayor virulencia de *Rhabditis regina* (100, 200, 400 y 800 nematodos/insecto) sobre los insectos plaga como son; los escarabajos descortezadores *Ips* sp. y *Dendroctonus* sp. y sobre insectos no blanco como son; larvas de los coleópteros y lepidópteros *Galleria mellonella* y *Tenebrio molitor*; el chapulín *Sphenarium purpurascens*; la chinche *Piezogaster indecorus* y la avispa *Polistes* sp.
- Determinar el número de días que tarda el nematodo *Rhabditis regina* en provocar una mayor mortalidad en sus hospederos.

Hipótesis

Si el nematodo entomopatógeno *Rhabditis regina* tiene respuesta densodependiente positiva al atacar a sus insectos hospederos, entonces los tratamientos con altas densidades de nematodo presentarán mayor efectividad en tiempo para inducir la mortalidad de hospederos.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Sitio de estudio

El municipio San José de Gracia (102°25' O y 22°09' N, 2050 m s.n.m.) tiene una superficie de 815.623 km² y está localizado en el Área Natural Protegida Sierra Fría en el noroeste del estado de Aguascalientes (Arriaga, 2009). Esta zona comprende una región montañosa constituida por varias serranías, valles, mesetas y cañadas (CONABIO, 1997).



Figura 1. Mapa de la ubicación del municipio San José Gracia en el estado de Aguascalientes.

Es una región montañosa con un rango altitudinal de 2,200 m a 3,050 m, su precipitación anual oscila entre los 600 mm y los 700 mm (SEDESO, 1993).

El clima del área es templado subhúmedo con lluvias en verano [C (w1) (b) (e) (g)] (Rzedowski, 1978). Presenta una temperatura anual entre -3°C y 18°C, la precipitación anual es de 600 mm (Arriaga, 2009)

Los principales tipos de vegetación son en su mayoría bosques de pino, las especies que encontramos son: *Pinus leiophylla*, *P. teocote.*, *P chihuahuana*, *P.*

lumholtzii y *P. duranguensis* (Díaz *et al.*, 2012). También se presentan otros tipos de vegetación como son; el bosque tropical seco, matorrales templados, áridos y subtropicales, chaparrales y pastizales (Díaz *et al.*, 2012).

4.2. Métodos

4.2.1. *Colecta de muestras de suelo.* Se colectaron muestras de suelo durante el mes de junio 2015 en distintas zonas de bosques de pino del ANP Sierra Fría. En un radio de 50 m, se eligieron 24 puntos aleatoriamente, extrayendo en cada punto un cubo de 15 cm² de suelo con una pala de mano (**Figura 2A**).

Las muestras de suelo se guardaron en costales etiquetados. Después, las 24 muestras de suelo se mezclaron homogéneamente, para obtener 2 kg de suelo total con una textura uniforme (**Figura 2B**), lo anterior debido a que más del 90% de los nematodos entomopatógenos se encuentran en los primeros 15 cm de la superficie del suelo (Choo *et al.*, 1995).



Figura 2. (A) Colecta de suelo con una pala. (B) Suelo mezclado homogéneamente.

La muestra de 2 kg fue transportada al laboratorio de Entomología Forestal del INIFAP, procurando evitar exponerlas a temperaturas elevadas. Posteriormente se almacenaron las muestras de suelo a una temperatura de 15°C (Stock, 1995).

4.2.2. *Aislamiento de nematodos entomopatógenos.* Se tamizó la muestra de suelo completamente mezclada (**Figura 3A**), y se colocó en 10 vasos de plástico de 5 ×

7 cm, saturados de suelo hasta un 90%; se hicieron orificios con una aguja en la tapa para permitir la ventilación. Posteriormente, se tomaron 20 larvas de *G. mellonella* del último instar, se lavaron con agua potable estéril para evitar la contaminación. Se colocaron cuatro larvas en cada uno de los vasos de plástico con suelo, se agregó vermiculita para mantener la humedad al 85% (**Figura 3 B-D**), y se incubaron a 23 °C durante 7 días en oscuridad (Poinar, 1979; Hominick y Briscoe, 1990; Glazer, 1992).



Figura 3. (A) Tamizado del suelo. (B) Suelo húmedo al 85%. (C) *G. mellonella* en infección con el suelo. (D) Vasos de suelo con *G. mellonella* rodeados de vermiculita para mantener la humedad.

Pasado el tiempo de incubación se separaron las larvas que presentaron síntomas de infección, como son una coloración ocre o negra, además que el cuerpo no presentara un mal olor. Después las larvas se lavaron con agua destilada estéril, y se desinfectaron superficialmente por inmersión en hipoclorito de sodio al 0.1% durante 30 segundos, posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril (Woodring y Kaya, 1988).

Las larvas desinfectadas superficialmente se colocaron en cámaras blancas, con la cual se extraen los juveniles infectivos (*J1*) de nematodos entomopatógenos (**Figura 4**). Las cámaras se armaron con una base de caja Petri (15 cm de diámetro)

y adentro de esta contiene otra base de caja Petri de menor tamaño invertida (10 cm de diámetro), sobre la cual se colocó un disco de papel filtro (15 cm) y encima de este disco se colocó una larva; finalmente se agregaron 25 ml de agua potable estéril. La recolección de juveniles infectivos se realizó al séptimo día (Nguyen y Smart, 1995).



Figura 4. Recolección de juveniles infectivos *J1* en cámaras blancas.

4.2.3. Reinfeción por nematodos entomopatógenos. La muerte de las larvas *G. mellonella* se verificó que fue provocada por los nematodos entomopatógenos aislados por medio de los postulados de Koch (Pelczar *et al.*, 1977). Los juveniles infectivos aislados de las cámaras blancas se agregaron a una caja de Petri para infectar a otro grupo de cinco larvas vivas del último instar de *G. mellonella* y así comprobar si estos nematodos entomopatógenos tienen el potencial de matar a las larvas de *G. mellonella* (Rueda *et al.*, 1993; García y Palomo, 1996).

4.2.4. Montajes temporales e identificación. Los nematodos entomopatógenos obtenidos de las cámaras blancas y cámaras de reinfeción se colectaron en tubos Falcon de 45 ml con 30 ml de agua destilada estéril. Con los nematodos obtenidos se realizaron 20 montajes temporales para exanimación morfométrica. La fijación de los ejemplares se realizó con una solución de TAF 90% + glicerina 10%.

Los nematodos se montaron en portaobjetos con 1 ml de fijador y cubreobjetos. Las preparaciones se realizaron con sellador polimérico transparente, se etiquetaron con el sitio de colecta y la fecha del montaje.

4.2.5. Medio de cultivo. Se realizó el medio sólido de dos dimensiones (agar- hígado de cerdo), el cual se preparó con agar al 1% en cajas Petri o frascos de vidrio y encima del agar se agregó un revestimiento de hígado de cerdo ahumado y procesado como paté. Los medios de cultivo se incubaron durante 24 h a una temperatura de 15°C. Luego de este periodo se inoculó una suspensión de 1000 nematodos (**Figura 5A**), esparciendo uniformemente la suspensión sobre la superficie del sustrato. Después de seis a siete días se obtuvieron juveniles (**Figura 5A**), y al incrementar su densidad poblacional consumieron completamente el revestimiento de hígado de cerdo; debido a esto, cada semana se le agregó carne al medio de cultivo con agar 1% (Martignoni, 1979).

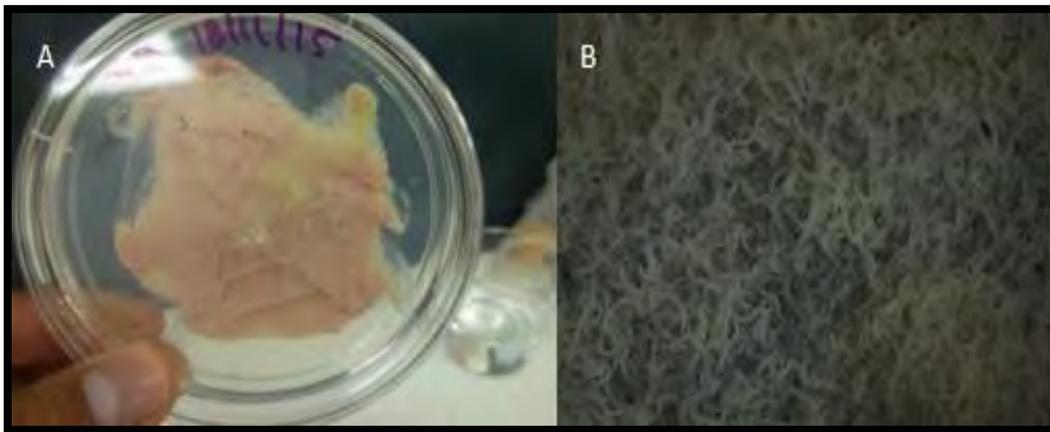


Figura 5. (A) Medio de cultivo después de la inoculación. (B) Acercamiento del medio de cultivo después de una semana de inoculación.

4.3. Obtención de insectos hospederos

4.3.1. Colecta de escarabajos descortezadores y avispas. En el bosque de pino de Pinalito de la Cruz (Sierra Gorda, Querétaro), se seleccionaron árboles con síntomas de infestación de escarabajos descortezadores (*Ips* o *Dendroctonus* sp.), los síntomas se manifiestan como una coloración rojiza en el dosel. Se cortaron

trozos de corteza de 10 × 10cm (**Figura 6**) a lo largo del árbol, la corteza se guardó en una hielera, además se colectaron escarabajos descortezadores del mismo árbol y se guardaron en tubos Falcon de 100 ml.



Figura 6. Pino descortezado.

Para la colecta de avispas (*Polistes* sp.) se colocaron trampas en el bosque de pino de Pinalito de la Cruz (Sierra Gorda, Querétaro) de Lindgren (**Figura 7**), que consistieron en una columna formada por embudos de plástico negro que se colgaron de una rama o del árbol de pino (Lindgren, 1983). Las avispas se guardaron en bolsas de plástico. El material colectado fue transportado al laboratorio de Entomología Forestal del INIFAP.



Figura 7. Colecta de avispas de la trampa Lindgren.

4.3.2. *Colecta de chapulines y chinches.* En octubre de 2015 se realizaron colectas de chapulines (*Sphenarium purpurascens*) adultos en la Reserva del Pedregal de San Ángel, CDMX. Estas colectas consistieron en redeos intensivos. Los chapulines colectados fueron transportados en recipientes de plástico al laboratorio y para las chinches (*Piezogaster indecorus*) la técnica de colecta fue de forma manual. El material colectado fue transportado al laboratorio de Entomología Forestal del INIFAP.

4.3.3. *Cría del gusano de cera y el gusano de harina.* Se compró un conjunto de machos y hembras del gusano de cera *G. mellonella* y el gusano de la harina *Tenebrio molitor*. Para la cría del gusano de cera se utilizó una dieta artificial, cuyos ingredientes fueron: miel de abeja, glicerina, levadura, cera de abejas y salvado de trigo (Realpe *et al.*, 2007).

Para obtener un kilogramo de la dieta, inicialmente se mezclaron 464 g de salvado de trigo y 69 g de levadura seca. Aparte, se derritieron 67 g de cera de abejas y se adicionaron a la primera mezcla (**Figura 8**). Posteriormente se adicionaron 207 g de glicerina y 193 g de miel de abejas. Esta mezcla se colocó en bandejas de plástico multiusos de 25 × 25 × 5cm (Realpe *et al.*, 2007). Se construyó una jaula en forma de cubo con marcos de madera de 50 × 50 cm (**Figura 8**), cubiertos con tela de tul para evitar la salida de adultos y llegando el momento ovopositaran y dieran inicio a un nuevo ciclo de vida.



Figura 8. (A) Dieta artificial para *G. mellonella*. (B) Jaula para la ovoposición de los adultos de *G. mellonella*.

Para la cría del gusano de harina (*T. molitor*), en una bandeja de plástico multiusos de 25 × 25 × 5 cm se preparó dieta con 500 g de salvado de trigo, al cual se le agregan trozos de madera para la ovoposición de los adultos. Ambos gusanos se mantuvieron en el laboratorio del INIFAP a 25°C a una humedad relativa cercana al 80% (**Figura 9**).



Figura 9. Dieta para la cría de *Tenebrio molitor*.

4.4. Pruebas de patogenicidad

4.4.1. Desinfección de insectos. Después de la colecta o cría de insectos, se procedió a su desinfección, la cual se realizó preparando una solución de hipoclorito de sodio al 0.01% en la cual se sumergieron los adultos y las larvas durante 30 s; luego se volvieron a sumergir en un recipiente con agua potable estéril durante 30 s, para eliminar el exceso de hipoclorito de sodio y de esa manera garantizar la sanidad de los mismos.

4.4.2. Extracción de nematodos del medio de cultivo y preparación de concentraciones. Para extraer los nematodos se tamizó el medio de cultivo y se enjuagaron los nematodos con agua potable estéril para evitar residuos del medio de cultivo. Posteriormente se realizó un conteo de nematodos empleando el método de dilución que consiste en extraer una alícuota de 0.5 ml de suspensión madre del

medio de cultivo con el cual se realizaron 3 diluciones en agua potable estéril y se contaron los nematodos.

El bioensayo se realizó siguiendo la metodología sugerida por Woodrin y Kaya (1988); el procedimiento consistió en preparar series logarítmicas de concentraciones, más un testigo con agua potable estéril. Las concentraciones utilizadas en este estudio fueron 100, 200, 400 y 800 nematodos por insecto (n/i), además del testigo.

Las unidades experimentales consistieron en cajas Petri con papel filtro Whatman, con el objetivo mantener la humedad. En cada caja Petri se colocaron cinco insectos adultos o larvas; se realizaron cuatro repeticiones por cada tratamiento para un total de 20 unidades experimentales (**Cuadro 1**).

Cuadro 1. Descripción de los tratamientos de patogenicidad de *Rhabditis regina* sobre cada uno de los insectos.

Concentración de nematodos / insectos (n/ i)	Insectos blancos	Total, de nematodos	Unidades experimentales
800	5	4000	4
400	5	2000	4
200	5	1000	4
100	5	500	4
0	5	0	4

4.4.3. Bioensayo. Una vez conociendo las respectivas concentraciones y preparadas las unidades experimentales, se procedió a inocular los nematodos con una micropipeta para cada concentración según el tratamiento. Las unidades experimentales fueron incubadas a 25°C. Las evaluaciones de la mortalidad se realizaron diariamente durante ocho días; para comprobar la muerte de los insectos por nematodos se colocaron cámaras blancas y se hicieron disecciones de los insectos infectados.

4.5. Análisis estadístico

Para determinar el efecto de las concentraciones de nematodos entomopatógenos y el tiempo que pasa a partir del contacto sobre la mortalidad de los insectos, así como la interacción entre ambas variables (concentración de nematodos \times tiempo), se realizó un modelo lineal generalizado (GLM; distribución de error tipo binomial y función de ligamiento logit) (Crawley, 2007). Los análisis se realizaron con el programa estadístico R versión 3.1.2. (R Core Team, 2015). Si las pruebas resultaran significativas, se realizaron pruebas de comparación múltiple de Tukey (Zar, 1984).

V. RESULTADOS

Se encontró que el nematodo *Rhabditis regina* es capaz de causar mortalidad en todos los insectos evaluados. Por otro lado, se observó un efecto significativo de la concentración de nematodos, el tiempo transcurrido y la interacción de los factores antes mencionados (concentraciones de nematodos × tiempo) sobre la mortalidad acumulada de *Galleria mellonella* (**Cuadro 2**) (Lepidoptera), *Tenebrio molitor* (Coleoptera) (**Cuadro 3**), *Dendroctonus* sp. (Coleoptera) (**Cuadro 4**), *Ips* sp. (Coleoptera) (**Cuadro 5**), *Sphenarium purpurascens* (Orthoptera) (**Cuadro 6**), y *Polistes* sp. (Hymenoptera) (**Cuadro 7**). Para *Piezogaster indecorus* se observó un efecto significativo de la concentración de nematodos, el tiempo transcurrido, pero en comparación con las demás especies de insectos no presentó un efecto significativo en la interacción de estos factores (**Cuadro 8**).

5.1. Pruebas de patogenicidad *in vitro*

5.1.1. *Mortalidad en G. mellonella*. Para las larvas de *G. mellonella*, desde el primer día de inoculación se obtuvo la mortalidad acumulada total (100%) con una concentración de 800 n/i, mientras que para las concentraciones de 400 n/i y 200 n/i esto se observó en el cuarto y quinto día la mortalidad acumulada total, respectivamente, y para el caso de 100 n/i ocurrió en el séptimo día (**Figuras 10**). *R. regina* provocó mayor virulencia contra este insecto, ya que llegó a la mortalidad acumulada total más rápido en comparación con el resto de los insectos evaluados.

Cuadro 2. Resultados del GLM (distribución de error tipo binomial y función logit) para probar el efecto del tiempo transcurrido, concentración de nematodos entomopatógenos y su interacción (tiempo × concentración) sobre la mortalidad acumulada del lepidóptero en *G. mellonella*.

Efecto	<i>g.l.</i>	Devianza	<i>g.l.</i> Residual	Devianza Residual	<i>P</i>
Tiempo	7	140.223	152	22.619	<0.001
Concentración	1	33.859	151	106.364	<0.001
Tiempo × Concentración	7	18.878	144	14.981	<0.001

Figura 10. Porcentaje de mortalidad de la larva de cera *G. mellonella* inoculados con cuatro concentraciones (100, 200, 400 y 800) del nematodo entomopatógeno *R. regina*; en los promedios que comparten letras no hay diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

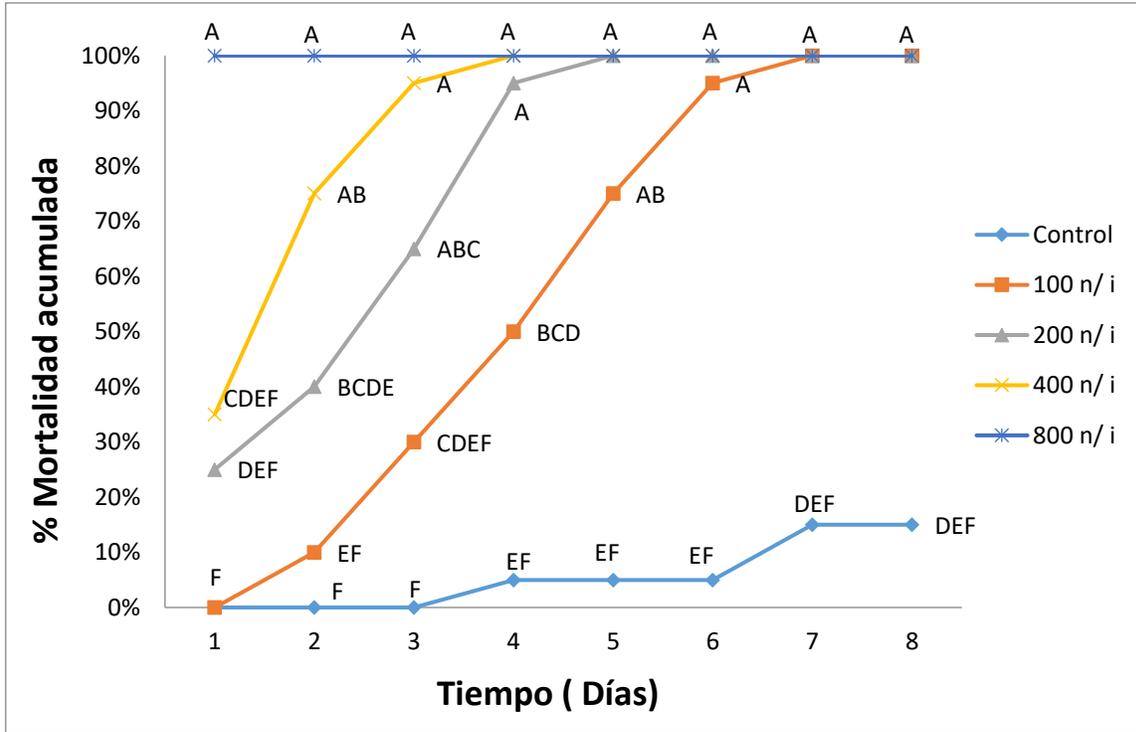
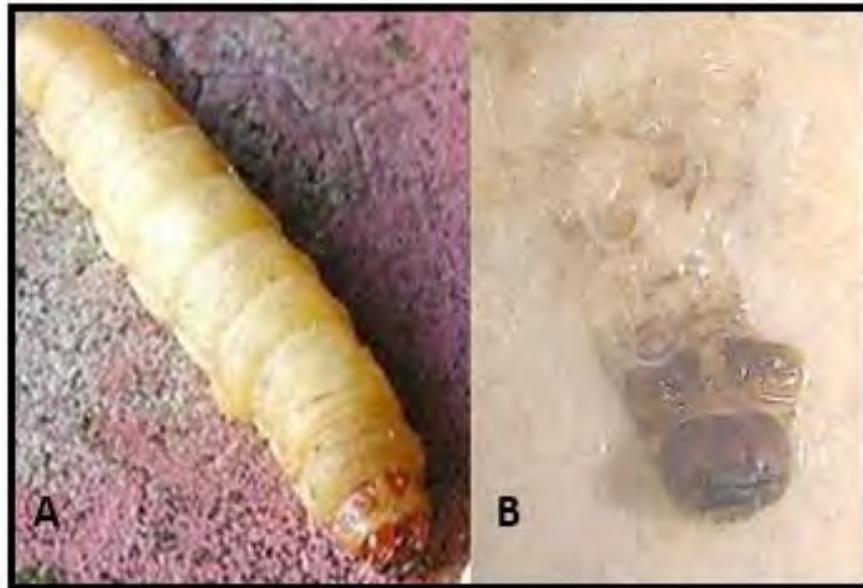


Figura 11. (A) Larva de *G. mellonella*. (B) Transcurridos 7 días, los nematodos entomopatógenos acabaron con el 90% del cuerpo de la larva.



5.1.2. *Mortalidad en T. molitor, Ips sp. y Dendroctonus sp.* Se observó para las especies de coleópteros, que la concentración de 100 nematodos por insecto (n/i) causó la mortalidad acumulada total del (100 %) en el octavo día (**Figuras 14 y 16**), excepto para la larva de *T. molitor* la mortalidad al octavo día fue de un 80 % (**Figura 12**). Por otra parte, la concentración de 200 n/i causó la mortalidad acumulada total en el séptimo día para estas tres especies de coleópteros; mientras que, la concentración de 400 n/i alcanzó la mortalidad total de *T. molitor* y *Dendroctonus sp.* al séptimo día (**Figuras 12 y 14**), a diferencia de *Ips sp.* que la alcanzó un día antes (sexto día) (**Figura 16**). Para la concentración más alta de 800 n/i, la mortalidad acumulada total se alcanzó en el cuarto día para el escarabajo *Ips sp.*, a diferencia de *T. molitor* y *Dendroctonus sp.* en lo cuales ocurrió hasta el sexto día (**Figuras 12 y 14**).

Cuadro 3. Resultados del GLM (distribución de error tipo binomial y función logit) para probar el efecto del tiempo transcurrido, concentración de nematodos entomopatógenos y su interacción (tiempo × concentración) sobre la mortalidad acumulada de *T. molitor*.

Efecto	<i>g.l.</i>	Devianza	<i>g.l.</i> Residual	Devianza Residual	<i>P</i>
Tiempo	1	76.666	158	66.137	<0.001
Concentración	1	35.692	157	40.974	<0.001
Tiempo × Concentración	1	26.728	156	8.964	0.002

Figura 12. Porcentaje de mortalidad del gusano de harina *T. molitor* inoculados con cuatro concentraciones (100, 200, 400 y 800) del nematodo entomopatógeno *R. regina*; en los promedios que comparten letras no hay diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

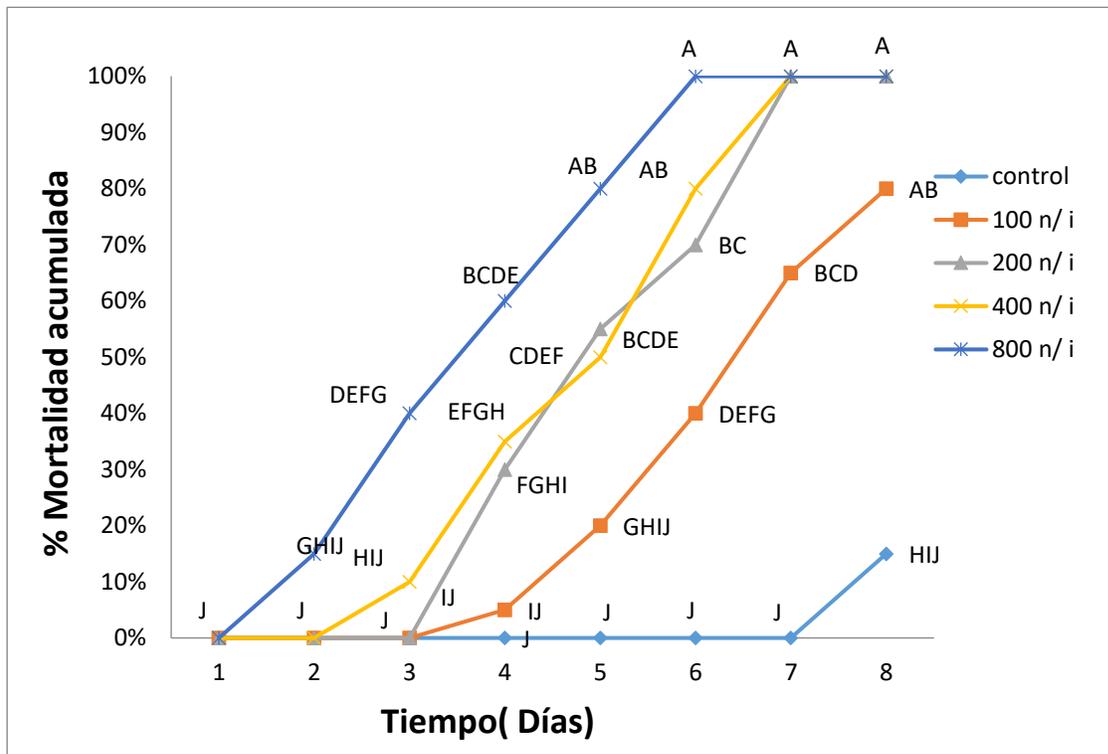
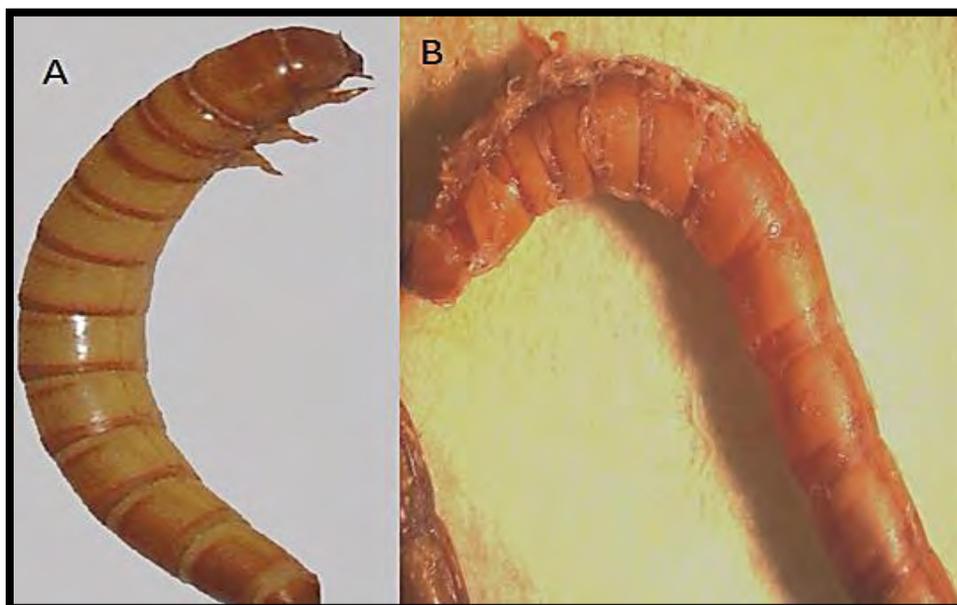


Figura 13. (A) Larva de *T. molitor*. (B) Emergencia de nematodos en la parte anterior de la larva de *T. molitor*.



Cuadro 4. Resultados del GLM (distribución de error tipo binomial y función logit) para probar el efecto del tiempo transcurrido, concentración de nematodos entomopatógenos y su interacción (tiempo × concentración) sobre la mortalidad acumulada del escarabajo *Dendroctonus* sp.

Efecto	<i>g.l.</i>	Devianza	<i>g.l.</i> Residual	Devianza Residual	<i>P</i>
Tiempo	1	89.511	158	65.122	<0.001
Concentración	1	43.288	157	46.223	<0.001
Tiempo × Concentración	1	32.335	156	10.952	<0.001

Figura 14. Porcentaje de mortalidad del escarabajo descortezador *Dendroctonus* sp. inoculados con cuatro concentraciones (100, 200, 400 y 800) del nematodo entomopatógeno *R. regina*; en los promedios que comparten letras no hay diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

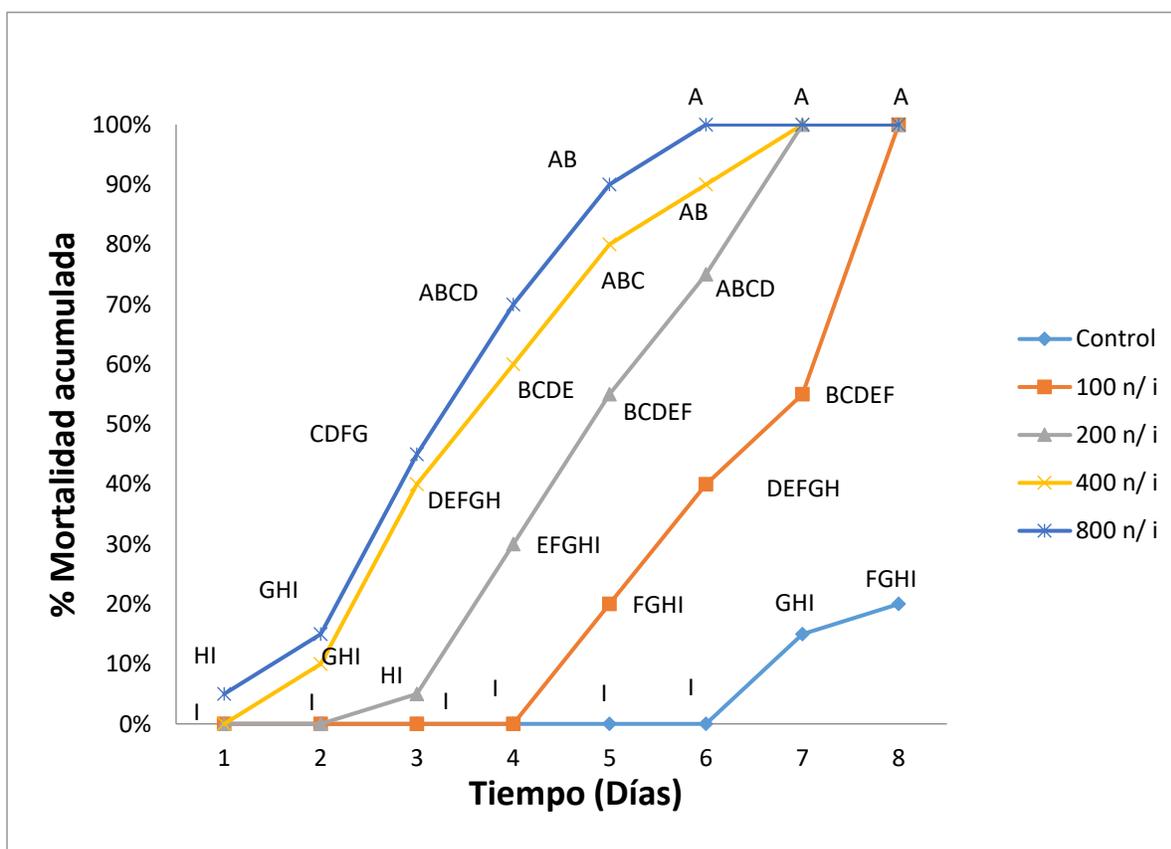


Figura 15. (A) Escarabajo adulto de *Dendroctonus* sp. (B) Emergencia de nematodos entomopatógenos *R. regina* del tórax del escarabajo.



Cuadro 5. Resultados del GLM (distribución de error tipo binomial y función logit) para probar el efecto del tiempo transcurrido, concentración de nematodos entomopatógenos y su interacción (tiempo × concentración) sobre la mortalidad acumulada del escarabajo *Ips* sp.

Efecto	<i>g.l.</i>	Devianza	<i>g.l.</i> Residual	Devianza Residual	<i>P</i>
Tiempo	1	104.553	158	56.783	<0.001
Concentración	1	42.648	157	61.905	<0.001
Tiempo × Concentración	1	23.413	156	19.235	<0.001

Figura 16. Porcentaje de mortalidad del escarabajo descortezador *Ips* sp. inoculados con cuatro concentraciones (100, 200, 400 y 800) del nematodo entomopatógeno *R. regina*; en los promedios que comparten letras no hay diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey.

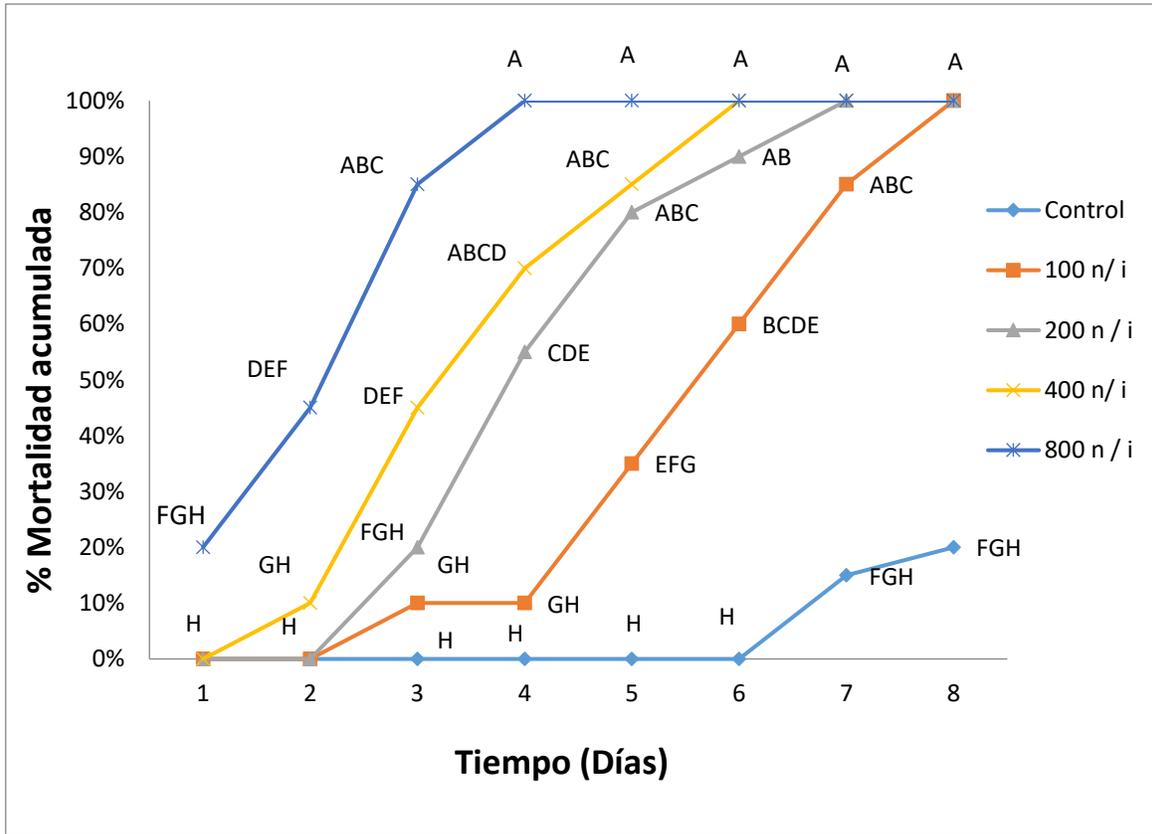
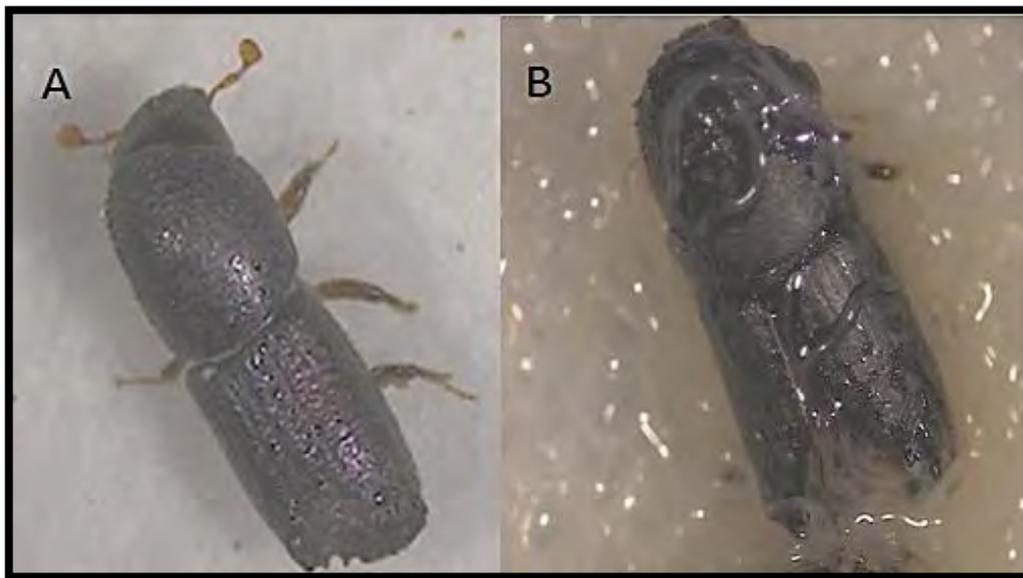


Figura 17. (A) Escarabajo adulto de *Ips* sp. (B) Emergencia de nematodos entomopatógenos *R. regina* de la parte anterior del abdomen.



5.1.3. *Mortalidad en S. purpurascens*. En cuanto al chapulín, la concentración de 100 n/i únicamente alcanzó el 35% de mortalidad; mientras que, en las concentraciones de 200, 400 y 800 n/i, la mortalidad acumulada total del (100%) se presentó en el octavo, séptimo y sexto día, respectivamente (**Figuras 18**).

Cuadro 6. Resultados del GLM (distribución de error tipo binomial y función logit) para probar el efecto del tiempo transcurrido, concentración de nematodos entomopatógenos y su interacción (tiempo × concentración) sobre la mortalidad acumulada del chapulín *S. purpurascens*.

Efecto	<i>g.l.</i>	Devianza	<i>g.l.</i> Residual	Devianza Residual	<i>P</i>
Tiempo	1	76.625	158	57.096	<0.001
Concentración	1	34.037	157	42.588	<0.001
Tiempo × Concentración	1	22.202	156	11.835	<0.001

Figura 18. Porcentaje de mortalidad del chapulín *S. purpurascens*, inoculados con cuatro concentraciones (100, 200, 400 y 800) de nematodos entomopatógenos *R. regina*; en los promedios que comparten letras no hay diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

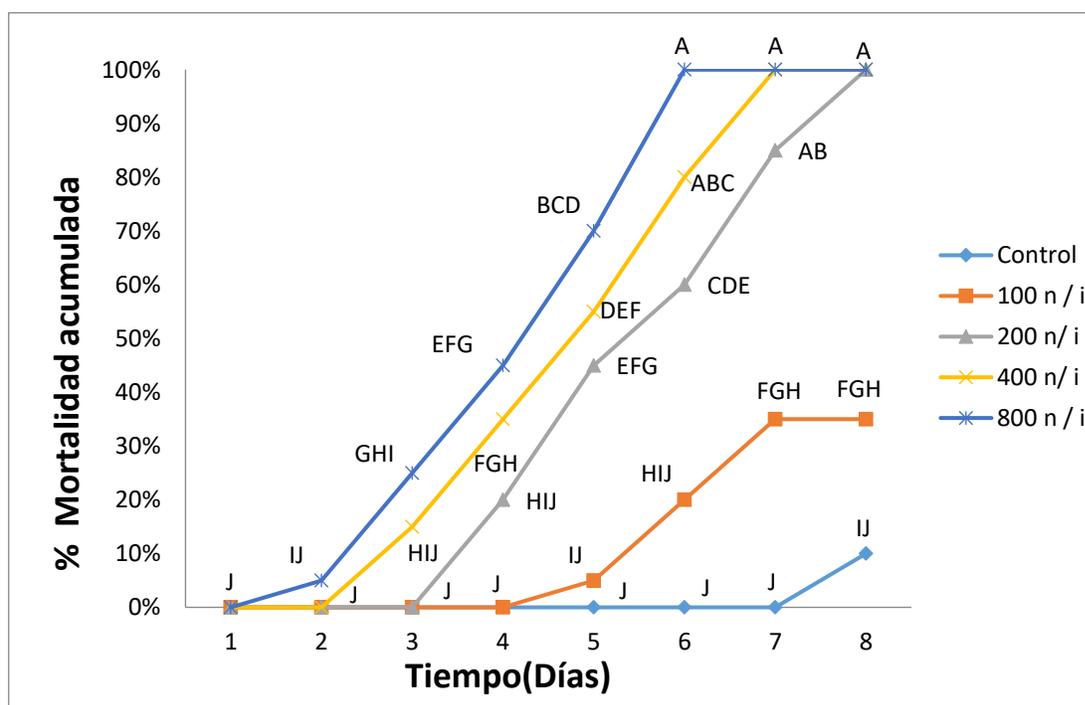
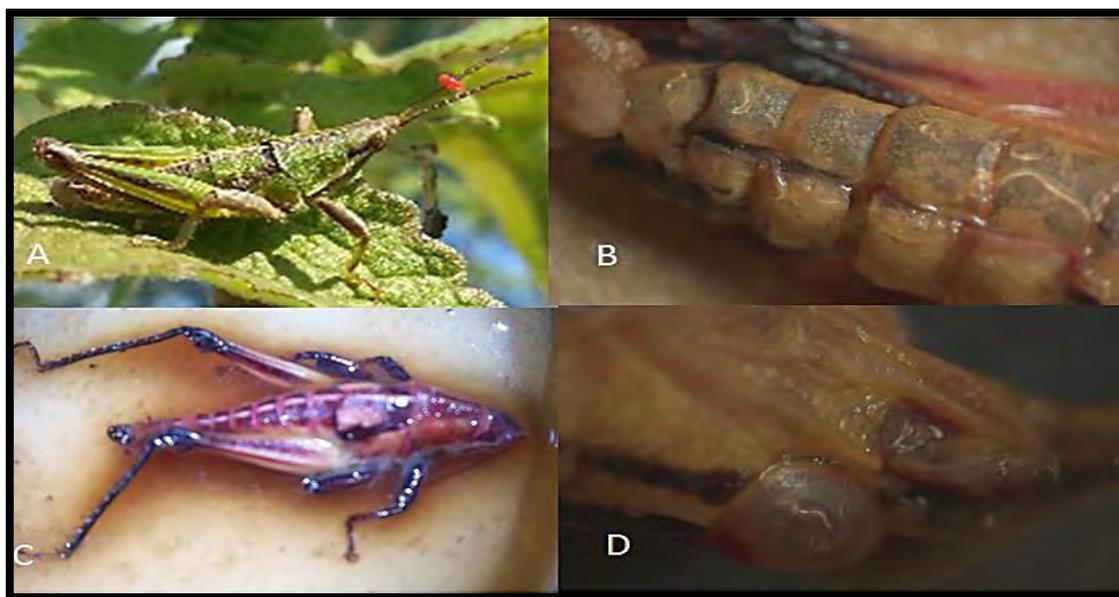


Figura 19. (A) Chapulín adulto de *S. purpurascens*. (B) Emergencia de nematodos en el abdomen. (C) Coloración rojiza de *S. purpurascens* debido al ataque de *R. regina*. (D) Ingreso de nematodos al ojo de *S. purpurascens*.



5.1.4. Mortalidad en *Polistes* sp. Se observó que para la avispa con la concentración de 100 n/i, alcanzó una mortalidad acumulada total (100%) hasta el séptimo día; con las concentraciones de 200 y 400 n/i se registraron en el sexto día con un comportamiento similar, y finalmente en el quinto día con la concentración de 800 n/i se alcanzó el 100% de mortalidad (**Figura 20**).

Cuadro 7. Resultados del GLM (distribución de error tipo binomial y función logit) para probar el efecto del tiempo transcurrido, concentración de nematodos entomopatógenos y su interacción (tiempo × concentración) sobre la mortalidad acumulada de la avispa *Polistes* sp.

Efecto	<i>g.l.</i>	Devianza	<i>g.l.</i> Residual	Devianza Residual	<i>P</i>
Tiempo	1	105.857	158	73.332	<0.001
Concentración	1	74.481	157	31.376	<0.001
Tiempo × Concentración	1	35.797	156	38.683	<0.001

Figura 20. Porcentaje de mortalidad de la avispa *Polistes* sp. inoculados con cuatro concentraciones (100, 200, 400 y 800) del nematodo entomopatógeno *R. regina*; en los promedios que comparten letras no hay diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey.

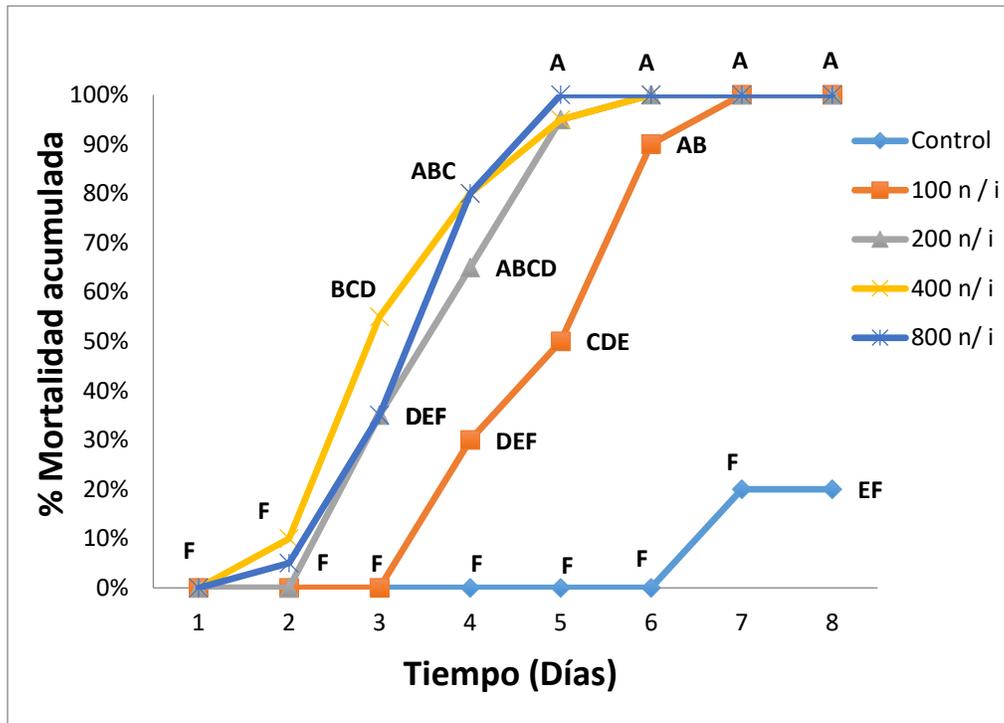


Figura 21. (A) Adulto de *Polistes* sp. (B) Emergencia de nematodos *R. regina* de la cabeza y el tórax.



5.1.5. *Mortalidad en P. indecorus*. La chinche no alcanzó el 100% de mortalidad acumulada en ningún tratamiento. En las concentraciones de 100 n/i y 200 n/i no presentó mortalidad; en contraste, la concentración de 400 n/i alcanzó el 20% de mortalidad y la de 800 n/i llegó al 60% de mortalidad acumulada (**Figuras 22**). Las chinches infectadas por *R. regina* presentaron coloración rojiza y emergencia de estos nematodos en el cuerpo del insecto (**Figura 23**).

Cuadro 8. Resultados del GLM (distribución de error tipo binomial y función logit) para probar el efecto del tiempo transcurrido, concentración de nematodos entomopatógenos y su interacción (tiempo × concentración) sobre la mortalidad acumulada de la chinche *P. indecorus*.

Efecto	<i>g.l.</i>	Devianza	<i>g.l.</i> Residual	Devianza Residual	<i>P</i>
Tiempo	1	26.754	88	4.9235	0.026
Concentración	1	5.849	87	20.9050	<0.001
Tiempo × Concentración	1	5.830	86	0.0191	0.889

Figura 22. Porcentaje de mortalidad de la chinche *P. indecorus*, inoculados con cuatro concentraciones (100, 200, 400 y 800) del nematodo entomopatógeno *R. regina*; en los promedios que comparten letras no hay diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Tukey.

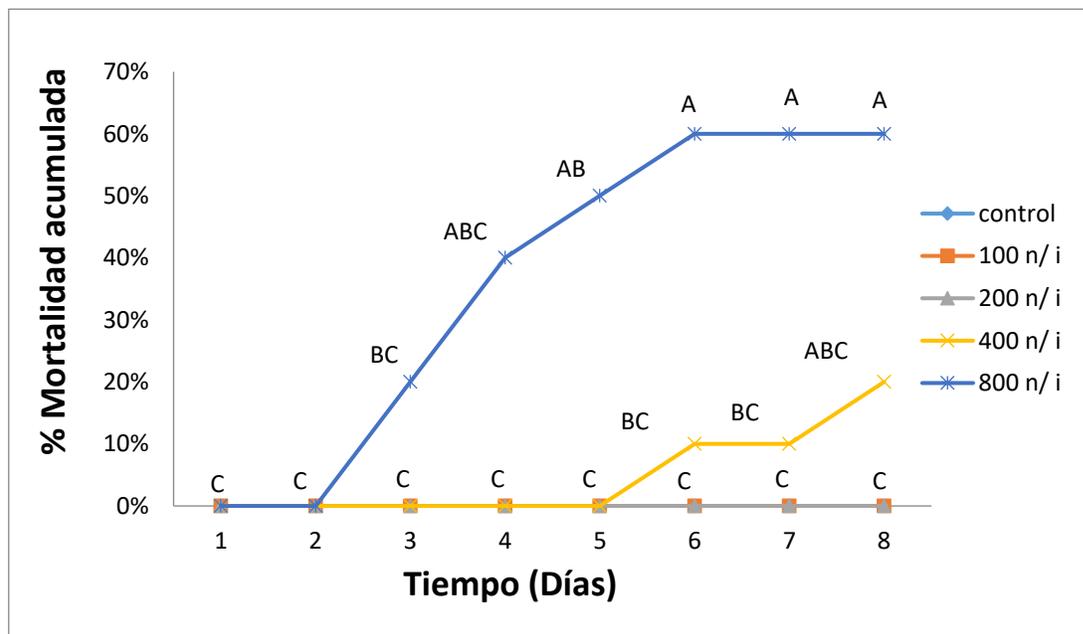
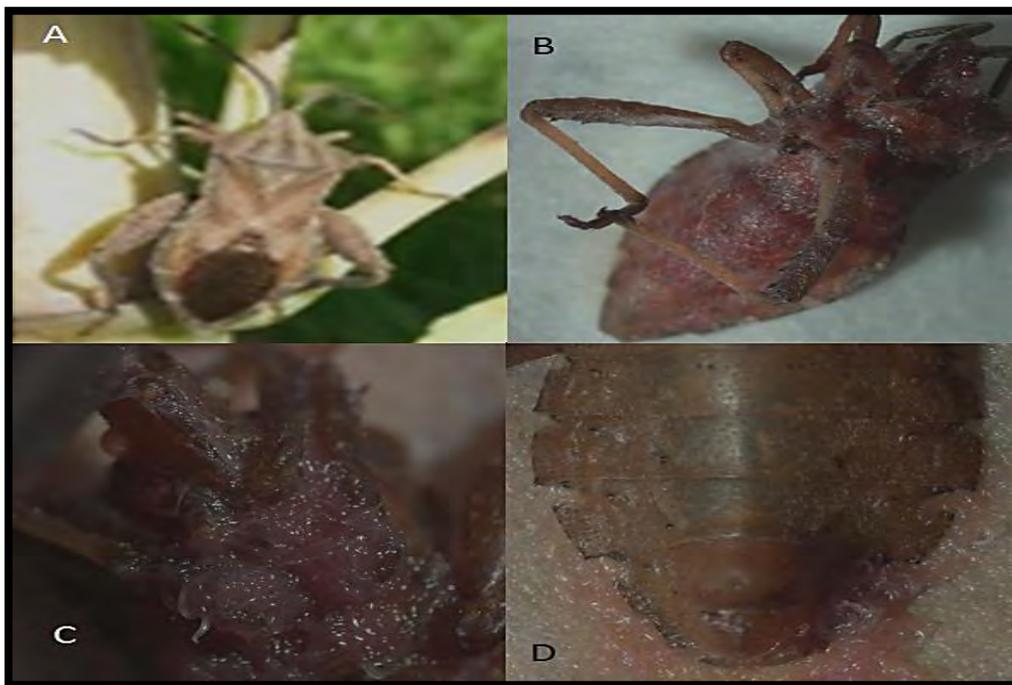


Figura 23. A) Chinche adulta de *P. indecorus*. B) Coloración rojiza de *P. indecorus* debido al ataque de *R. regina*. C) Emergencia de nematodos del torax. D) Emergencia de nematodos del abdomen.



El patrón general que se observó fue que *R. regina* provocó el 100 % de mortalidad con las concentraciones más altas (800, 400 y 200 n/i) en casi todos los insectos, excepto para *P. indecorus*, que con ninguna concentración alcanzó la mortalidad del 100%. Además, se observó que cuando se inoculó una menor concentración (100 n/i) en los insectos mayor fue el tiempo para lograr una mortalidad del 100%, e inclusive en *T. molitor* solo se alcanzó una mortalidad del 80% y para el caso de *S. purpurascens* tan solo fue del 35%, mientras que para el tratamiento control la mortalidad fue menor al 20 % para todas las especies de insectos. Se observó que generalmente a medida que la concentración es más alta, se llega a la mortalidad total en menor tiempo.

VI.DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos incrementan el ámbito de hospederos de *Rhabditis regina* en condiciones de laboratorio, ya que provocó altas mortalidades en la mayoría de los insectos. Se determinó que los órdenes de insectos más susceptibles al ataque por *Rhabditis regina* fueron: las larvas del lepidóptero (*Galleria mellonella*), los coleópteros (*Dendroctonus* sp., *Ips* sp. y *Tenebrio molitor*), el himenóptero (*Polistes* sp.), el ortóptero (*Sphenarium purpurascens*) y el hemíptero (*Piezogaster indecorus*).

La eficiencia del nematodo *R. regina* es influenciada por sus concentraciones, debido a que una gran cantidad de nematodos entomopatógenos provocan de manera más rápida la muerte de los insectos, además de una mayor mortalidad. Estos resultados posiblemente se deben a que los nematodos entomopatógenos penetran en el cuerpo de los insectos con individuos suficientes para causar una fuerte infección en breve tiempo (Schmidt y All, 1978).

6.1. Mortalidad en los insectos

6.1.1. Larvas *G. mellonella* y *T. molitor*. Se encontró que *R. regina* mostró una alta eficiencia para el control de larvas *G. mellonella*, en comparación con las demás especies de insectos a las cuales se le realizaron las pruebas de patogenicidad, ya que desde el primer día de inoculación con una concentración de 800 n/i se obtuvo la mortalidad total (**Figura 10**).

Los resultados observados en *G. mellonella* son similares a los encontrados por Tambong *et al.*, (2014), en donde probaron cepas de la bacteria *Serratia marcescens* aisladas de nematodos entomopatógenos *Rhabditis* sp. para determinar su patogenicidad, encontraron que todas las cepas del género *Serratia* fueron potencialmente patógenas contra larvas de *G. mellonella*, provocando la muerte en 48 h. Sin embargo, los hallazgos de este estudio no apoyan las conclusiones obtenidas por Schulte y Poinar (1991) que realizaron pruebas de patogenicidad con *R. regina* en condiciones de laboratorio en donde los juveniles infectivos provocaron del 30% al 40% de mortalidad de *G. mellonella* después de 70 días. En contraste, este estudio desde el primer día de inoculación se obtuvo la

mortalidad total con una concentración de 800 n/i, mientras que para las concentraciones de 400 n/i y 200 n/i esto se observó en el cuarto y quinto día, respectivamente y para el caso de 100 n/i ocurrió en el séptimo día (**Figura 10**).

En comparación con la larva del escarabajo *T. molitor* al sexto día se alcanzó el 100% de mortalidad con una concentración de 800 n/i, al séptimo día con la concentración de 400 n/i y 200 n/i y con 100 n/i tan solo se llegó a un 80% de mortalidad (**Figura 12**). Aunque ambas especies (*G. mellonella* y *T. molitor*) fueron probadas en estadios de larva, hay grandes diferencias en cuanto a los días que llegan al 100% de mortalidad, la principal diferencia podría ser que *T. molitor* tiene una capa de cutícula muy gruesa que dificulta la entrada del nematodo y esto podría retardar la mortalidad de esta larva; en comparación con *G. mellonella* que tiene una cutícula más delgada (Koppenhöfer *et al.*, 2000).

Algunas características defensivas de las larvas están estrechamente vinculadas a la edad y a la proximidad de la pupación (Koppenhöfer y Fuzy, 2006); por ejemplo, destaca la respuesta inmune asociada a la edad, donde los estadios iniciales del insecto poseen una respuesta de anticuerpos más baja que los estadios maduros (Koppenhöfer y Fuzy, 2006). Los estadios más desarrollados de insectos pueden eliminar patógenos invasores de manera más eficiente, en comparación con estadios de larva (Koppenhöfer y Fuzy, 2004).

La mortalidad de las larvas debido al nematodo *R. regina* coinciden con los obtenidos por Nuñez, (2008), que muestra que la bacteria *Serratia entomophila* asociada con el nematodo *R. regina* es patógena hacia larvas de escarabajos plaga del género *Phyllophaga*. Aún falta realizar estudios amplios que tomen en cuenta todas las características morfológicas, fisiológicas, conductuales y la respuesta inmune en estadios de larva, para diseñar estrategias y combatir a un insecto plaga en estadios iniciales.

6.1.2. Escarabajos descortezadores. Los coleópteros del género *Dendroctonus* e *Ips* son descortezadores que infestan bosques de pino (Turchin *et al.*, 1991). Estos escarabajos atacan y matan a los árboles tanto en forma individual, en grupos, o incluso en grandes epidemias, donde una vez iniciado el ataque pueden

permanecer por años. En los bosques naturales de México, el ataque por descortezadores ha causado la pérdida de aproximadamente 400,000 m³ de madera por año durante los últimos 20 años (Cibrián y Cibrián, 1998).

Hay evidencia limitada del uso de nematodos entomopatógenos para el control de escarabajos descortezadores en los bosques de pino, esta investigación encontró que las especies de coleópteros *Ips* sp. y *Dendroctonus* sp., con la concentración de 100 n/i de *R. regina*, tuvieron la mortalidad total en el octavo día. Por otra parte, la concentración de 200 n/i causó la mortalidad total en el séptimo día; mientras que la concentración de 400 n/i alcanzó la mortalidad total de *Dendroctonus* sp. al séptimo día, a diferencia de *Ips* sp. que la alcanzó en el sexto día. Para la concentración más alta de 800 n/i, la mortalidad total se alcanzó en el cuarto día para el escarabajo *Ips* sp., a diferencia de *Dendroctonus* sp. en lo cuales ocurrió hasta el sexto día (**Figuras 14 y 16**). Los resultados son similares con Kepenekci y Atay, (2014), reportan que el nematodo entomopatógeno nativo de Turquía *Heterorhabditis bacteriophora* a 25°C y con una concentración de 1000 juveniles infectivos, mostró un potencial para el control de larvas del escarabajo *Dendroctonus micans* provocando una mortalidad del 94.04%.

El control de estos escarabajos se ha realizado mecánicamente; el método consiste en el derribo del arbolado plagado, eliminando la corteza, así como ramas afectadas y posteriormente la quema el árbol. Este método es muy efectivo, pero hay el riesgo de provocar incendios, principalmente en el periodo de sequía, afectando un número mayor de árboles que ni una epidemia provocaría (Rodríguez., 1990).

También se han utilizado insecticidas; pero el problema con estos agentes químicos es que son efectivos para controlar a los escarabajos descortezadores por un lapso corto provocando altas mortalidades en las plagas, pero algunos individuos con características favorables sobreviven a los tratamientos y posteriormente logran desarrollar niveles de resistencia más altos. Además, los insecticidas tienen efectos negativos en el suelo, agua, y al entrar en contacto con el aire liberan gases tóxicos al ambiente (Monzón, 2001). Por tales implicaciones, el uso de *R. regina* se propone para combatir esta plaga; además, es uno de los primeros reportes en México del

combate de estos escarabajos descortezadores con nematodos entomopatógenos, teniendo resultados positivos.

El escarabajo *Hylobius abietis* es un coleóptero de la familia Curculionidae que provoca daños muy importantes a las coníferas tanto en el norte (Petersson y Orlander, 2003) como en el sur de Europa (Frayse y Saintonge, 1996).

Los nematodos *Steinernema carpocapsae* y *Heterorhabditis downesi* se aplicaron a 150 hectáreas en el bosque de Coillte (Irlanda), donde en cada árbol se dispersaron 3.5 millones de nematodos. Se observó una reducción del escarabajo *H. abietis* del 37% con la especie de nematodo *S. carpocapsae* y una reducción del 70% con *H. downesi* (Dillon *et al.*, 2008).

6.1.3. El chapulín *S. purpurascens*. El orden Orthoptera ha llegado a ocupar una gran importancia en México, debido a que se ha convertido en una plaga que provoca pérdidas económicas entre el 20% y 30% de la producción agrícola cuando no se realizan acciones de control (SAGARPA, 2012). Entre las especies que han llegado a tener gran importancia económica destacan: *S. purpurascens*, *S. mexicanum*, *Melanoplus* spp., *Taeniopoda eques* y *Brachystola magna*, afectando en el Altiplano y Norte de México una superficie territorial de 300,000 ha aproximadamente (Fontana *et al.*, 2008).

El chapulín con la concentración de 800 n/i obtuvo una mortalidad del 100% al sexto día (**Figura 18**). Mahar *et al.*, (2006) reportan que las especies de nematodos entomopatógenos *S. carpocapsae*, *S. feltiae*, *H. indica* y *H. bacteriophora* con la concentración más alta evaluada de (200 JII/ml) resultaron ser las especies de nematodos más eficientes para el control de la langosta del desierto *Schistocerca* al décimo día.

6.1.4. La avispa *Polistes* sp. Las avispas juegan un papel importante en los bosques de pino ya que son los polinizadores principales de las plantas con flores; también reducen la cantidad de muchas especies de insectos plaga. Las avispas *Polistes canadensis* y *P. erythrocephalus* son enemigos naturales de *Erinnys* una polilla que afecta las plantaciones de yuca (West-Eberhard, 2006).

Las avispas *Polistes* sp. son esenciales para el funcionamiento del ecosistema, pero también pueden convertirse en insectos plaga como sucedió en 1988 que se introdujo en las islas Galápagos la especie *P. versicolor* y para 1991 se había convertido en una plaga debido a que se alimentaba de las abejas nativas interrumpiendo el ciclo de la polinización de las flores (West-Eberhard, 2006).

El nematodo *R. regina* podría ser un potencial controlador biológico para *Polistes* sp., ya que mostró una mortalidad acumulada del 100% en las cuatro concentraciones empleadas (**Figura 20**). Ulu *et al.* (2015) evaluaron diferentes especies de nematodos entomopatógenos contra el himenóptero *Hoplocampa flava* L. en condiciones de laboratorio. La especie más patógena fue *Heterorhabditis bacteriophora* con la concentración de 15 JI/larva alcanzó una mortalidad del 90%; en comparación con nuestros resultados, no se requirió una elevada concentración de nematodos entomopatógenos para provocar altas mortalidades en *Polistes* sp. ya que con la concentración más baja de 100 n/i al séptimo día se presentó el 100% de la mortalidad total.

6.1.5. La chinche *P. indecorus*. El hemíptero fue la única especie que no presentó 100% de mortalidad en ninguna de las concentraciones de *R. regina* (**Figura 22**), esto podría deberse a que su cutícula es muy gruesa en comparación con las demás especies de insectos evaluadas en este estudio. Como indican Koppenhöfer y Fuzy (2004), el grosor de la cutícula desempeña un papel importante en la susceptibilidad de los insectos al ataque de nematodos entomopatógenos. Además, *P. indecorus* posee un aparato bucal chupador con estilete que podrían dificultar o impedir la penetración de los nematodos a través de la boca, aunque aún no existen evidencias concretas (Eidt y Thurston, 1995).

En la chinche *P. indecorus* las concentraciones de *R. regina* de 400 n/i y 800 n/i únicamente provocaron una mortalidad del 20% y 60% respectivamente (**Figura 22**). Los hallazgos de este estudio son consistentes con Márquez *et al.*, (2005) que evaluaron cepas aisladas de nematodos entomopatógenos del género *Heterorhabditis* en donde se muestra una patogenicidad creciente con respecto al

incremento en la concentración entre 3000 y 6000 juveniles infectivos sobre la chinche hedionda *Scaptocoris talpa* (Hemiptera: Cydnidae).

6.2. Elementos condicionantes de la infección de *R. regina*

La condición hermafrodita del género *Rhabditis* podría provocar un porcentaje de mortalidad alto, aun utilizando concentraciones bajas de nematodos (Carta y Osbrink, 2005); esto implica que pueden reproducirse por sí mismos, por lo que un solo nematodo se requiere para causar la muerte al insecto hospedero e iniciar de nuevo su ciclo de vida (Kaya y Koppenhöfer, 1999).

Se ha registrado que la eficiencia de los nematodos entomopatógenos para infectar a su hospedero se ve reducida arriba de los 30°C y abajo de los 15°C (Molyneux, 1985; Kaya, 1990; Kung *et al.*, 1991). En general la mortalidad de los insectos debido a la infección por nematodos entomopatógenos se reduce en temperaturas frías por la disminución de la habilidad del nematodo para moverse (Griffin y Downes, 1991). Las pruebas de patogenicidad sobre los distintos insectos se realizaron a una temperatura de 25°C, la cual se considera óptima para que *R. regina* se desempeñara de manera eficiente, lo que podría explicarnos porque provocó mortalidad en los siete insectos en las diferentes concentraciones.

La mortalidad de los siete insectos debido a *R. regina* apoyan aún más la idea de que en una caja Petri las condiciones físicas son ideales y el contacto hospedero-nematodo está asegurado (Gaugler *et al.*, 1997), lo cual puede ser totalmente diferente con la aplicación de los nematodos entomopatógenos en campo, lo cual se explicará en los siguientes apartados.

Algunos de los factores que también afectan la eficiencia de los nematodos entomopatógenos, es que los insectos han evolucionado con diferentes tipos de conductas que reducen la probabilidad de ser infectados; algunas de estas conductas reducen la probabilidad de ser encontrados o la penetración de los nematodos al cuerpo del insecto (De Bach, 1964). Otra conducta puede ser la que se observó en *S. purpurascens* y *P. indecorus*, que tuvieron una mayor producción de defecación, lo que podría reducir la infección por la vía del ano (De Bach, 1964). También una baja liberación de CO₂ disminuye las señales químicas de los

nematodos para encontrar a su hospedero. Principalmente esto se ha documentado en larvas de lepidópteros y escarabajos (Tanada y Kaya, 1993).

La formación de cubiertas protectoras y el movimiento de los insectos evita la infección de los nematodos entomopatógenos (Koppenhöfer *et al.*, 2000); en este estudio se observó que la larva *G. mellonella* formó una gran cantidad de capullos de seda que probablemente usó como barreras físicas. Algunas conductas de evasión de los insectos pueden reducir el contacto con los nematodos como ocurrió con *S. purpurascens*, *P. indecorus* y *Polistes* sp. que movían de manera constante sus patas y alas.

En condiciones naturales, los factores abióticos juegan un papel importante en el desempeño de *R. regina*; principalmente, la desecación, radiación solar, y las temperaturas extremas afectan a los nematodos entomopatógenos (Gaugler *et al.*, 1997).

Los nematodos entomopatógenos cuando son introducidos en ecosistemas naturales se enfrentan a la depredación y parasitismo por la fauna endémica (Ishibashi y Kondo 1987).

En condiciones de laboratorio no existen factores bióticos que limiten el crecimiento poblacional de *R. regina*, como son colémbolos y ácaros que son sus principales depredadores (Epsky *et al.*, 1988). También los nematodos del género *Rhabditis* son susceptibles a la infección por protozoos intracelulares (Poinar, 1988). Algunos hongos también pueden atacar a los nematodos entomopatógenos, no obstante, la cutícula de los nematodos actúa como una barrera contra la invasión de hongos (Kaya, 1990).

6.3. Ventajas y desventajas del uso de nematodos entomopatógenos

Los nematodos entomopatógenos tienen baja toxicidad para organismos vertebrados; están exentos de registro en los EE. UU. por la EPA (US Environmental Protection Agency), además de que existen muchas especies comercialmente disponibles, y pueden ser aplicados con equipo convencional y tienen la capacidad de ir en búsqueda de su hospedero (Ramos-Rodriguez *et al.*, 2006).

Los pesticidas químicos no se pueden desplazar por el agua o en el suelo y tienden a decaer en unos días. Los nematodos entomopatógenos son móviles y persistentes, ellos se reciclan dentro del insecto hospedero, manteniendo así su efecto a largo plazo. (Ralf-Udo, 2001).

Los nematodos entomopatógenos pueden ser aplicados en conjunto con otros pesticidas biológicos y/o químicos, fertilizantes, mejoradores del suelo y frecuentemente son más económicos mezclarlos con estos insumos para su aplicación (Cuthbertson *et al.*, 2003). No obstante, algunos pesticidas pueden reducir la infectividad y la supervivencia de los nematodos como lo determinaron Fedoroko *et al.*, (1977) al exponer con el insecticida oxamilo al nematodo *Steinernema carpocapsae* lo que provocó el incremento en su mortalidad.

Dentro de los atributos negativos, se encuentra el amplio ámbito de hospederos, el cual puede incluir a insectos benéficos que están relacionados con el insecto plaga; además tienen limitada tolerancia a condiciones ambientales como son: requerimientos de humedad, tiempo corto de almacenamiento y altos costos en comparación con los pesticidas químicos (Kaya, 1993).

6.4. *R. regina* como agente de control biológico de plagas de insectos

Como se determinó en este estudio y en otros trabajos científicos citados a lo largo de este texto, se plantea que el efecto de los nematodos está fuertemente relacionado entre la interacción del nematodo entomopatógeno y la especie de insecto. Se considera a *R. regina* como un buen candidato para el control de cualquiera de los insectos evaluados, a excepción de *P. indecorus*, debido a su baja o nula mortalidad con las concentraciones evaluadas.

El uso de concentraciones altas aumenta su eficiencia, en comparación con otras especies de nematodos entomopatógenos. Conocer esta interacción entre nematodo-hospedero facilitaría la selección del mejor nematodo entomopatógeno y su inclusión como controlador biológico.

En México, el empleo de nematodos entomopatógenos para el control de plagas en sistemas agrícolas y forestales es limitado, se requieren más estudios que demuestren la eficiencia en el control de diferentes órdenes de insectos plaga

ya que el éxito de su regulación depende del conocimiento de la taxonomía, biología, ecología y conducta (Nicholls, 2008).

El uso de estos nematodos entomopatógenos debe ser extendido a distintas áreas, con el fin que sean ampliamente investigados y utilizados. Se sugiere seguir con los estudios de aislamiento, cultivo, capacidad de búsqueda, dispersión, persistencia en diferentes sustratos, patogenicidad en condiciones de laboratorio, invernadero y aplicación en campo, así como determinar los factores bióticos y abióticos que interviene en la patogenicidad de *R. regina*.

VII. CONCLUSIONES

Dados los resultados obtenidos y la discusión se formulan las siguientes conclusiones:

1. El nematodo entomopatógeno *Rhabditis regina* es capaz de matar a los insectos plaga como son; los escarabajos descortezadores *Ips* sp. y *Dendroctonus* sp. y también a los insectos no blanco como son; larvas de los coleópteros y lepidópteros *Galleria mellonella* y *Tenebrio molitor*; el chapulín *Sphenarium purpurascens*; la chinche *Piezogaster indecorus* y la avispa *Polistes* sp.
2. La mortalidad en los hospederos depende de la concentración de nematodos: para *G. mellonella*, *T. molitor*, *Dendroctonus* sp., *Ips* sp., *S. purpurascens* y *Polistes* sp. la concentración de 800 n/i fue la que ocasionó mayor virulencia en menor tiempo, seguida de las concentraciones de 400, 200 y 100 n/ i.
3. La chinche *P. indecorus* fue la única especie que presentó una menor mortalidad del 60% y el 20%, con las concentraciones de 800 y 400 n/i respectivamente, y nula mortalidad con las concentraciones de 200 y 100 n/i.
4. Este estudio mostró que *R. regina* es candidato para ser una agente de control biológico contra los insectos evaluados.

LITERATURA CITADA

Adams, B.J. y K.B. Nguyen. 2002. Taxonomy and Systematics. En: Entomopathogenic Nematology. Gaugler, R. (ed.). CAB International, 1-33 pp.

Akhurst, R. J. y Smith, K. 2002. Regulation and safety. Entomopathogenic Nematology. Gaugler R (Ed.). CAB International, Reino Unido, 311-332 pp.

Arriaga, C. L. 2009. Regiones prioritarias y planeación para la conservación de la biodiversidad, en Capital natural de México, vol. II: Estado de conservación y tendencias de cambio. CONABIO, México, 433-457 pp.

Badii, M.H., J. Landeros, E. Cerna y S. Varela. 2007. Depredación entre artrópodos. Pp. 75-89. In: L.A. Rodríguez del Bosque y H. Arredonodo (eds). Teoría y Aplicación del Control Biológico. AMCB, Prometeo Editores, 303 pp.

Baldwin, J. G., Nadler S. A. y Wall D.H. 2000. Nematodes: Pervading the earth and linking all life. In: Raven PH, Williams T, editors. Nature and human society: The quest for a sustainable world. Proceedings of the 2000 Forum on Biodiversity. Washington, DC: National Academy Press.176-91 pp.

Bale, J. 2011. Harmonization of regulations for invertebrate biocontrol agents in Europe: progress, problems and solutions. Journal of Applied Entomology, 135: 503-513 pp.

Bale, J. S., Van Lenteren, J. C. y Bigler, F. 2008. Biological control and sustainable food production. Phil. Trans. R.Soc, 363:761–776 pp.

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

Behle, R. W., McGuire, M. R., Gillespie, R. L., y Shasha, B. S. 1997. Effects of alkaline gluten on the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis*. J. Econ. Entomol. 90(2): 354-360.

Boemare, N. 2002. Biology, Taxonomy and Systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In: Entomopathogenic nematology. CAB International 2002 (ed. R. Gaugler). 311-326 pp.

Boemare, N.E., Laumond, C. y Mauleon, H. 1996. The entomopathogenic nematode bacterium complex: biology, life cycle and vertebrate safety. Biocontrol Science and Technology. 33-34 pp.

Brugberg, M. B., Nes, I. F. y Eijsink, V. G. H. 1996. The chitinolytic system of *Serratia marcescens*. Chitin Enzymology, 2: 171-180.

Carta, L.K. y W. Osbrink. 2005. *Rhabditis rainai* n. sp. (Nematoda: Rhabditida) associated with the Formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae). Nematology, 7 (6): 863-879.

Casadevall, A y Pirofski, L. 1999. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. Infect Immun; 67:3703-3713.

Cepeda, M. S. 1996. Nematología Agrícola. Editorial Trillas. Primera Edición. México, 301 p.

Choo, H.Y. Kaya, H.K. y Stock, S.P. 1995. Isolation of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) from Korea. Japanese Journal of Nematology, 25, 45–51 pp.

Cibrián, T., J. y D. Cibrián, T. 1998. Las plagas y enfermedades de los bosques de México. Memoria del Ciclo de Conferencias: El Sector Forestal de México, Avances y Perspectivas. México, D. F, 19-23 pp.

CONABIO. 1997. Provincias biogeográficas de México. Escala 1: 4 000 000. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México.

Connell, J. H. 1983. Diversity and coevolution of competitors, or the ghost of competition past. *Oikos* 35:131-138.

Coto, D., J. Saunders., C. Vargas y King, A. B. S.1995. Plagas invertebradas de cultivos tropicales con énfasis en América Central: un inventario. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza CATIE, Área de Fitoprotección. Turrialba, Costa Rica, 200 pp.

Crawley, M.2007. Count data. En: *The R book*. John Wiley & Sons. Inglaterra, 251-258 pp.

Cuthbertson, A.G.S., Head, J., Walters, K.F.A. y Gregory S.A. 2003. The efficacy of the entomopathogenic nematode, *Steinernema feltiae*, against the immature stages of *Bemisia tabaco*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 83:267–269.

De Bach, P. 1964. *Biological Control of Insect Pests and Weeds*. London: Chapman and Hall, 844 p.

De ley, P. y Blaxter, M. L. 2002. Systematic position and phylogeny. In: *The Biology of Nematodes*. Lee, D.L. (Ed.). Taylor and Francis, London. 1-30 pp. Diego. Chapter, 6:281-324.

Díaz, V., Sosa R., J. y Pérez S., D. 2012. Distribución y abundancia de las especies arbóreas y arbustivas en la Sierra Fría, Aguascalientes, México. *Polibotánica*, 34: 99-126,.

Didem, S.G., Keskin N. y Hazir S. 2006. Ecological characterization of *Steinernema anatoliense* (Rhabditida: Steinernematidae) Journal of Invertebrate Pathology 92:39-44.

Dillon, Aoife B., Moore, Colm P., Downes, Martin J. y Griffin, Christine. 2008. Evict or infect? Managing populations of the large pine weevil, *Hylobius abietis*, using a bottom-up and top-down approach. Forest Ecology and Management, 255 (7): 2634-2642. ISSN 0378-1127

Doucet, M. M. A y Gabarra, R. 1994. On the occurrence of *Steinernema glaseri* (*Steinernema*, 1929) (Steinernematidae) and *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1975 (Heterorhabditidae) in Catalogne, Spain. Fund. Appl. Nematol, 17:441-443 pp.

Eidt, D.C., Thurston G.S 1995. Physical deterrents to infection by entomopathogenic nematodes in wireworm (Coleoptera: Elateridae) and other soil pests. Can Entomol, 127: 423-429.

Epsky, N. D., Walter, D. E., y Capinera, J. L. 1998. Potencial role of nematophagous microarthropods as biotic mortality factors of entomogenous nematodes (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae). Journal of Economic Entomology. 81: 82-825 pp.

Fedorko, A., A. Kamionek., J. Kozłowska y E.Miaowska.1977.The effect of vydate-oxamyl on nematodes of different ecological groups. Polish Ecological Studies, 3(2): 89-93.

Fontana, P, Buzzetti FM y Mariño P. 2008. Chapulines, langostas, grillos y esperanzas de México. Guía fotográfica. Edición Hand Books, Verona.

Frayse, J. Y. y Saintonge, F. X. 1996. Forest plantations: a new product for protection against *Hylobius abietis* in maritime pine stands. Informations Forêt, Afocel Arnef, 4: 6 pp.

García, P. F., y Palomo, F. A. 1996. Natural occurrence of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhadtidae) in spanish soils. Journal of Invertebrate Pathology, 68, 84-90 pp.

Gatehouse, A. M. R., Hilder V. A., y Boulter D. 1992. Potential of plant derived genes in the genetic manipulation of crops for insect resistance, in: Biotechnology in Agriculture No 7: Plant Genetic Manipulation for Crop Protection. CAB International. 155-181 pp.

Gaugler, R. 1988. Ecological considerations in the biological control of soil inhabiting insects whit entomopathogenic nematodes. Agriculture Ecosystems y Environmental, 24:351-360 pp.

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

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

Glazer, I. 1992. Survival and efficacy of *Steinernema carpocapsae* in an exposed environment. Biocontrol Science and Technology, 2:101–107.

Greathead, D. J. y Waage J. K. 1983. Opportunities for biological control of agricultural pests in developing countries. The World Bank, Washington, D.C., World Bank Technical Paper Number, 11- 44 pp.

Griffin, C. T., y Downes, M. D. 1991. Low temperature activity in *Heterorhabditis* sp. (Nematoda; Heterorhabditidae). *Nematologica*, 37: 83 -91.

Hajek, A. E. 2004. *Natural Enemies. An introduction to biological control*. Cambridge University Press, New York, 5 p.

Hominick, W. M. y Briscoe, B.R. 1990. Survey of 15 sites over 28 months for entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae). *Parasitology*, 100: 289-294.

Ishibashi, N., y E. Kondo. 1987. Dynamics of the entomogenous nematode *Steinernema feltiae* applied to soil with and without nematicide treatment. *Journal of Nematology*, 19:404-412.

Ishibashi, N., Kondo, E. 1990. Behavior of infective juveniles. In: *Entomopathogenic nematodes in biological control*. Gaugler R.; Kaya, H. K., (Eds). Boca Raton, CRC Press. 139-150 pp.

Jiménez-Cortés, J. G., Canales-Lazcano, J., Lara-Reyes, N., Rosenblueth, M., Martínez-Romero, E. y Contreras-Garduño, J. 2016. Microbiota from *Rhabditis regina* may alter nematode entomopathogenicity. *Parasitol Res*, 115(11):4153-4165.

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

Kaya, H. K. 1990. Soil ecology. In: *Entomopathogenic nematodes in biological control*. Gaugler R.; Kaya, H. K. (Eds). Boca Raton (USA), CRC Press, 93-115 pp.

Kaya, H. y Koppenhöfer. 1999. Biology and ecology of insecticidal nematodes en: Optimal use of insecticidal nematodes in pest management. Nueva Jersey, Universidad Rutgers, 101 p.

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

Kepekci, I. y Atay T. 2014. Evaluation of aqueous suspension and entomopathogenic nematodes infected cadaver applications against the great spruce bark beetle *Dendroctonus micans* (Kugelann), (Coleoptera: Scolytidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 24(2), 335-339 pp.

Koppenhöfer, A. M., M. Wilson, I. Brown, H. K. Kaya y R. Gaugler, 2000. Biological control agents for white grubs (Coleoptera: Scarabaeidae) in anticipation of the establishment of the Japanese Beetle in California. *Journal of Economic Entomology*, 93 p.

Koppenhöfer, A. M. y Fuzy, E. M. 2004. Effect of white grub developmental stage on susceptibility to entomopathogenic nematodes. *Journal of Economic Entomology*. Vol. 97(6). 1842-1849 pp.

Koppenhöfer, A. M., y Fuzy, E. M. 2006. Effect of soil type on infectivity and persistence of the entomopathogenic nematodes *Steinernema scarabaei*, *Steinernema glaseri*, *Heterorhabditis zealandica*, and *Heterorhabditis bacteriophora*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 92:11–22 pp.

Koppenhöfer, A.M. y Kaya, H.K., 1997. Additive and synergistic interactions between entomopathogenic nematodes and *Bacillus thuringiensis* for scarab grub control. *Biol. Control* 8, 131–137 pp.

Kung, S.P., Gaugler, R. y Kaya, H. K. 1991. Effects of soil temperature, moisture and relative humidity on entomopathogenic nematode persistence. *Journal of Invertebrate Pathology*, 57: 242-249.

Kuris, A.M. 2003. Did biological control cause extinction of the coconut moth, *Levuana iridescens*, in Fiji? *Biological Invasions*, 5: 131-141.

Lara, R., Castro, B., Castro, G., Castro, M., Malpica, S. 2003. La Importancia de los Nematodos de Vida Libre. Departamento El Hombre y su Ambiente. División de CBS UAM Xochimilco. 48: 43-46.

Lemire, S., Coderre, D., Vincent, C. y Bélair, G. 1996. Lethal and sublethal effects of the entomogenous nematode, *Steinernema carpocapsae*, on the coccinellid *Harmonia axyridis*. *Nematropica*, 26: 284–285.

Li, P., Dai, C, Bao, H., Chen, L., Gao, D., Wang, G., Wang, J., Wang, H., Yedid, G. y Zhang, K. 2015. A new species of *Pristionchus* (Rhabditida: Diplogastridae) and its bacterial symbiont from Yixing, China. *J Nematol*, 47:190–197.

Lindgren, B. S. 1983. A multiple funnel trap for scolytid beetles (Coleoptera). *Can. Ent*, 115: 299-302 pp.

Mahar, A. N., Jan, N. D., Gowen, S. R., Hague, N. G. M., Al-Siyabi, A. A. y Mahar, A. Q. 2006. *A comparative study on the effectiveness of laboratory bioassays of entomopathogenic nematodes against desert locust nymphs Schistocerca gregaria (Acrididae: Orthoptera)*. *Pakistan Journal of Nematology*, 24:151-161 pp.

Marquez, J. M., Ralda, G., López E. y Maldonado D. 2005. Parasitismo de dos nematodos entomopatógenos (*Heterorhabditis* spp) sobre chinche hedionda (*Scaptocoris talpa*, Hemiptera: Cydnidae) y gusano alambre (*Dipropus* spp. Coleoptera: Elateridae), bajo condiciones de laboratorio. *Memorias Resultados de Investigación Centro Guatemalteco de Investigación CENGICANÑA*, 89-95 pp.

Martignoni, M. E. 1979. Producción masiva de insectos. Control biológico de las plagas de los insectos y malas hierbas. México, D. F. CECOSA, 679 -715 pp.

Molyneux, A.S.1985. Survival of infective juveniles of *Heterorhabditis* spp. and *Steinernema* spp. (Nematoda: Rhabditida) at various temperatures and their subsequent infectivity for insects. *Revue de Nématologie*, 8:165-170.

Monzón, A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo Integrado de Plagas*, 63: 95-103 pp.

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

Nguyen, K. B. y G. C. Smart, Jr. 1990. *Steinernema scapterisci* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae). *Journal of Nematology*, 22:187-199.

Nicholls E. y Clara I. 2008. Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico. Universidad de Antioquia, Medellín, 282 p.

Nishiwaki, H., K. Ito, M. Shimomura, K. Nakashima, y K. Matsuda. 2007. Insecticidal Bacteria Isolated from Predatory Larvae of the Antlion Species *Myrmeleon bore* (Neuroptera: Myrmeleontidae). *J. Invertebr Pathol*, 96.1: 80-88.

Núñez-Valdez, M. E.2008. Identification of a putative *Serratia entomophila* mexican strain pathogenic against root damaging larvae of Scarabaeidae (Coleoptera). *Appl. Environ. Microbiol*, 74:802-810.

Ordentlichy, A., Elad y Chet I.1988. The role of Chitinase of *Serretia marcescens* in Biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology*. 78: 84-88.

Parkman J. P. y Smart, G.C. Jr. 1996. Entomopathogenic nematodes, a case study: introduction of *Steinernema scapterisci* in Florida. Biological Science and Technology.423-429 pp.

Patel, M. N., Perry, R. N. y Wright, D. J. 1997. Desiccation survival and water contents of entomopathogenic nematodes, *Steinernema* spp. (Rhabditida: Steinernematidae). International Journal for Parasitology. Vol. 27:61-70 pp.

Pelczar, M. J. Jr, Reid., R. D. y Chan, E.C.S. 1977. Microbiology. (4^a ed.). New York, EE. UU; McGraw-Hill, Book Co.

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

Petersson, M. y Orlander, G. 2003. Effectiveness of combinations of shelterwood, scarification, and feeding barriers to reduce pine weevil damage. Canadian Journal of Forest Research 33: 64-73.

Pimentel, D. y Lehman, H. 1993. The pesticide questions. Chapman and Hall, N.Y.
Poinar G. O., Jr. 1988. A microsporidian parasite of *Neoaplectana glaseri* (Steinernematidae: Rhabditida) Revue de Nematologie, 11:359–361.

Poinar, G. O. Jr. 1979. Nematodes for biological control of insects. Boca Ratón, FL USA: CRC. Press. 277pp.

Poinar, G.O, Jr. 1989. Non- insect host for the entomopatogenous rhabditoid nematodes *Neoaplectana* (Steinernematidae) and *Heterorhabditis* (Heterorhabditidae). Rev. Nématol, 12: 423- 428.

Poinar, G. O. Jr y Hom, A. 1986. Survival and horizontal movement of infective stage *Neoaplectana carpocapsae* in the field. *Journal of Nematology*, 34 -36 pp.

R Core Team. 2015. R: A lenguaje and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL < <http://www.cran.r-project.org/>>

Ralf-Udo, E. 2001. Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. *Applied Microbiological Biotechnology*, 56:623-633.

Ramón de Lara, A., Castro, B., Castro, M. y Malpica, S. 2003. La importancia de los Nematodos de Vida Libre. *UAM, Xochimilco, México*, 48: 43 pp.

Ramos-Rodríguez, O., Campbell, J. F. y Ramaswamy, S. 2006. Pathogenicity of three species of entomopathogenic nematodes to some major stored- product insects. *J. Stored Prod. Res.* 42: 241-252.

Realpe A., F. J.; Bustillo P., A. E.; López N. y J. C. 2007. Optimización de la cría de *Galleria mellonella* (L.) para la producción de nematodos entomopatógenos parásitos de la broca del café. *Cenicafé*, 58(2):142-157.

Rey J. M. 1976. Gestión sobre plagas en entomología. *Graellsia*, 32: 279-306.

Rios-Rosillo F. y S. Romero-Parra. 1982. Importancia de los daños al maíz por insectos del suelo en el estado de Jalisco, México (Coleoptera). *Folia Entomológica*.

Rodríguez, L. R. 1990. Plagas forestales y su control en México. Universidad Autónoma Chapingo. México. 217 p.

Romanyk, N., y D. Kadahia. 2002. Plagas de insectos en las masas forestales. Ediciones Mundi Prensa, Madrid. 336 pp.

Rosales L. C., Suárez, H., Nava R. y Tellechea V. 1999. Nematodos entomopatógenos. Investigadores. FONAIAP. Centro Nacional de Investigaciones

Agropecuarias. Departamento de Protección Vegetal. Laboratorio de Nematología. Ed. Fionap Divulga. Vol. 63 pp.

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

Rzedowski, J. 1978. *Vegetación de México*. Ed. Limusa. México, D.F. 432 pp.

SAGARPA. 2012. *Guía de plaguicidas Autorizados de Uso Agrícola*. Dirección Estatal de Sanidad Vegetal

Schmidt, J. y All., J. N. 1978. Chemical attraction of *Neoplectana carpocapsae* (Nematoda: Steinernematidae) to insect larvae. *Environmental Entomology* (Estados Unidos) v. 7:605-607 pp.

Schulte, F. y G. O. Poinar. 1991. Description of *Rhabditis (Rhabditoides) regina* n. sp. (Nematoda: Rhabditidae) from the body cavity of beetle larvae in Guatemala. *Rev de Nematologie*, 14: 151-156 pp.

SEDESOL. 1993. *Estudio para la declaratoria de la Sierra Fría como área natural protegida*. Volumen 2. Primera edición, SEDESOL. Aguascalientes.

Selcuk, H., Stock, S. P., Kaya H. K., Koppenhöfer A. M. y Keskin, N. 2001. Developmental temperature effects on five geographic isolates of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* (Nematoda: Steinernematidae) *Journal of Invertebrate Pathology*, 77: 243–250.

Selfa, J. y Anento, J. L. 1997. *Plagas agrícolas y forestales*. Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa. 20:75-91.

Stasiuk S. J., Scott, M.J. y Grant, W. N. 2012. Developmental plasticity and the evolution of parasitism in an unusual nematode, *Parastrongyloides trichosuri*. *EvoDevo*, 3:1–14. doi:10.1186/2041-9139-3-1.

Stock, S. P. 1995. Natural populations of entomopathogenic nematodes in the Pampean region of Argentina. *Nematropica*. 143-148 pp.

Summy, K.R. y J.V. French. 1988. Biological control of agricultural pests: concepts every producer should understand. *J. Rio Grande Valley Hort. Soc.* 41:119-133.

Tambong, J. T. 2013. Phylogeny of bacteria isolated from *Rhabditis* sp. (Nematoda) and identification of novel entomopathogenic *Serratia marcescens* strains. *Curr Microbiol* 66:138–144. doi:10.1007/s00284-012-0250-0.

Tambong, J.T., Xu, R., Sadiku, A., Chen, Q., Badiss y Yu, Q. 2014. Molekular detection and analysis of a novel metalloprotease gene of entomopathogenic *Serratia marcescens* strains in infected *Galleria mellonella*. *Canadian Journal of Microbiology* 60: 203-209. Dxdoi. org/10.1139/cjm-2013-0864.

Tanada y Kaya, H. K. 1993. Nematode, nematomorphs, and plathelminthes. In: *Insect pathology*. Chapter 13. San Diego, USA, Academic Press. 666 pp.

Turchin, P., P. R. Jr. Lorio., A. Taylor y Billings R. F. 1991. Why do populations of southern pine beetles (Coleoptera: Scolytidae) fluctuate. *Environ. Entomol.* 20: 401-409 pp.

Ulu, T. C, Sadic, B., Susurluk, I. A. y Aksit, T. 2015. Virulence of four entomopathogenic nematode species for plum sawfly, *Hoplocampa flava* L. (Hymenoptera: Tenthredinidae). *Uludag University, Faculty of Agriculture, Department of Plant Protection, Turkey*, 12: 274-277 pp.

West-Eberhard, M.J. 2006. Polistine Passions. *Annales Zoologici Fennici*, 43: 387-389.

Woodring, J. L. y Kaya, H. K. 1988. Steinernematidae and Heterorhabditidae nematodes: A handbook of biology and techniques. Bulletin 331. Arkansas Agriculture Experiment Station, Fayetteville, Arkansas. 28 p.

Wouts, W. M. 1991. *Steinernema* (Neoaplectana) and *Heterorhabditis*. Manual of agricultural nematology. Nickle, W. R. (Ed.). New York. Marcel Dekker. 855-897 pp.

Zar, Jerrold H. 1984. Biostatistical Analysis. Segunda Edición. Prentice-Hall. 697p.