



UNIVERSIDAD NACIONAL “PEDRO RUIZ GALLO”



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA /
MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

TESIS

TÍTULO: “Conservación de nematodos entomopatógenos
(*Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis*
sp., *nativa*) en tres sustratos a diferentes tiempos y
temperaturas de almacenamiento, en laboratorio.
Junio 2015 – Enero 2016”

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

Presentada por:

Bach. MARIS ESTELA CAJUSOL VÉLIZ

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
LICENCIADA EN BIOLOGÍA - MICROBIOLOGÍA –
PARASITOLOGÍA

Presentada por:

Bach. LISETH REQUEJO SANCHEZ

ASESORA: Dra. CARMEN CALDERÓN ARIAS

Lambayeque – Perú

2016



UNIVERSIDAD NACIONAL “PEDRO RUIZ GALLO”

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA /
MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA



TESIS

**“Conservación de nematodos entomopatógenos
(*Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp., nativa)
en tres sustratos a diferentes tiempos y temperaturas de
almacenamiento, en laboratorio. Junio 2015 – Enero 2016”**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
LICENCIADA EN BIOLOGÍA**

Presentada por:

Bach. MARIS ESTELA CAJUSOL VÉLIZ

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
LICENCIADA EN BIOLOGÍA - MICROBIOLOGÍA –
PARASITOLOGÍA**

Presentada por:

Bach. LISETH REQUEJO SANCHEZ

APROBADO POR:

Dr. César Estela Campos
PRESIDENTE

Dr. Luis E. Chicoma Chaqui
SECRETARIO

MSc. Marco A. Guzmán Tello
VOCAL

Dra. Carmen P. Calderón Arias
ASESORA

“Uno debe liberarse del odio, debe abandonar el orgullo, debe despojarse de todas las ataduras. El sufrimiento toma al que no controla la mente, el cuerpo y sus pasiones”

DEDICATORIA

Este trabajo de tesis, tiene nuestro tiempo, nuestras ideas, nuestros deseos y sueños, es una manera de mostrar que si tenemos objetivos y somos perseverantes sin duda alguna lo podemos cumplir.

AGRADECIMIENTOS:

A **Dios**, por darme la vida, salud, sabiduría, y fuerza para seguir adelante y así cumplir con mis objetivos.

A mis padres, **Angel Petronio** y **Rosa Elena**, por brindarme todo su amor, apoyo incondicional, por inculcarme buenos valores, y estar conmigo siempre dándome sus consejos y motivación para triunfar en la vida. Los amo con todo mi corazón.

A mis hermanos: **Indira Gandhi**, **Serioga Igory** y **Angela Miluz**, por brindarme su apoyo, sus consejos y estar conmigo en los buenos y malos momentos.

A la **Dra. Carmen Calderón Arias**, asesora de nuestra tesis, por darnos su confianza, brindarnos muchos aportes y enseñanzas que nos sirvieron de mucho para realizar nuestra tesis.

Al Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) Vista Florida- Lambayeque, laboratorio de biocontroladores, que nos permitió realizar esta investigación, en especial a la Ing. **Maria Elena Neyra Espejo**, y **Darwin Pérez**.

¡GRACIAS!

Maris Estela Cajusol Véliz

AGRADECIMIENTOS:

A **Dios**, por haber cambiado mi vida, mostrarme que con esfuerzo y dedicación todo se puede, estoy muy agradecida por darme la perseverancia a seguir adelante.

A mis padres **Angel Gabriel** y **Ofelia**, por brindarme todo su amor, apoyo y comprensión, así también transmitirme su valor para no darme por vencida.

A mis hermanos **Miguel Angel**, **Yosimar** y **Gabriel Sinoe**, gracias por todo su apoyo, sus consejos por el cariño que me brinda día a día.

A mi cariño **Mako Fernández** por ser mi guía, brindarme su apoyo y comprensión en todo momento.

A la **Dra. Carmen Calderón Arias** por dirigir nuestra tesis, tenernos paciencia, fomentar la confianza en nosotras y ser incondicional para en cualquier situación.

A la Ing. **Maria Elena Neyra Espejo**, **Darwin Pérez** trabajadores del Laboratorio de Biocontroladores del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) Vista Florida-Lambayeque, quienes me brindaron su apoyo incondicional en esta investigación.

A mis amigos de Universidad Leydi, Claudia, Jean, Anthony, Gianfranco, Jorge, Juan Diego, pero en especial a Denis por brindarme su amistad, su apoyo, y transmitirme sus buenos deseos en todo momento.

¡GRACIAS!

Liseth Requejo Sánchez

Índice

I.	INTRODUCCIÓN.....	13
II.	ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	17
III.	MARCO TEÓRICO.....	23
3.1.	Nematodos Entomopatógenos	23
3.1.1.	<i>Generalidades.....</i>	23
3.1.2.	<i>Biología y hábitos de los Nematodos Entomopatógenos.</i>	25
3.2.	<i>Producción de nematodos entomopatógenos en laboratorio de biocontroladores.</i>	26
3.2.1.	<i>Control Biológico con nematodos entomopatógenos.</i>	28
3.3.	<i>Conservación de nematodos entomopatógenos</i>	30
○	<i>Conservación en suelo</i>	30
○	<i>Conservación en agar</i>	31
○	<i>Conservación en esponja</i>	31
○	<i>Influencia del tiempo y temperatura en el desarrollo y conservación de los nematodos entomopatógenos</i>	32
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
4.1.	Área de estudio.....	33
4.2.	Materiales y métodos.....	33
4.2.1.	<i>Población y muestra de estudio.</i>	33
4.2.2.	<i>Diseño del proceso de investigación de los 3 sustratos que se procesaron.</i>	34
4.2.3.	<i>Crianza de <i>Galleria mellonella</i> L. (<i>Lepidóptero: Pyralidae</i>)</i>	36
4.2.4.	<i>Producción y multiplicación de nematodos entomopatógenos infectivos juveniles (IJ) en el Laboratorio de Biocontroladores del Instituto Nacional de Innovación Agraria Estación Experimental “Vista Florida” – Lambayeque.</i>	37
○	<i>Multiplicación de los nematodos entomopatógenos (<i>Heterorhabditis bacteriophora</i> y <i>Heterorhabditis</i> sp., nativa).....</i>	37
4.2.5.	<i>Cuantificación de nematodos entomopatógenos</i>	40
4.2.6.	<i>Conservación de nematodos entomopatógenos (<i>Heterorhabditis bacteriophora</i> y <i>Heterorhabditis</i> sp., nativa) en base a tres sustratos, dos temperaturas y cuatro tiempos de almacenamiento.</i>	41
○	<i>Conservación en sustrato suelo.....</i>	41
○	<i>Conservación en sustrato agar.....</i>	46
○	<i>Conservación en sustrato esponja.....</i>	50

4.2.7.	<i>Mortalidad de larvas de Galleria mellonella por nematodos entomopatógenos</i>	52
4.2.8.	<i>Análisis estadístico</i>	53
V.	RESULTADOS	54
5.1.	Calcular la mortalidad de larvas de <i>Galleria mellonella</i> por nematodos entomopatógenos (<i>Heterorhabditis bacteriophora</i> y <i>Heterorhabditis</i> sp., <i>nativa</i>) en tres sustratos de conservación (suelo, agar y esponja)	54
5.2.	Calcular la mortalidad de larvas de <i>Galleria mellonella</i> por nematodos entomopatógenos (<i>Heterorhabditis bacteriophora</i> y <i>Heterorhabditis</i> sp., <i>nativa</i>) a diferentes tiempos de almacenamiento y dos temperaturas.	60
VI.	DISCUSIÓN	65
VII.	CONCLUSIONES	68
VIII.	RECOMENDACIONES	69
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

Índice de Tablas

Tabla 1.	Tratamiento de los tres sustratos (suelo, agar nutritivo y esponja) con tres repeticiones a dos temperaturas y cuatro tiempos de almacenamiento	34
Tabla 2.	Porcentaje de mortalidad de larvas de <i>Galleria mellonella</i> infestadas por <i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	56
Tabla 3.	Porcentaje de mortalidad de larvas de <i>Galleria mellonella</i> infestadas por <i>Heterorhabditis</i> sp., <i>nativa</i>	56
Tabla 4.	Análisis de varianza de nematodos entomopatógenos (<i>Heterorhabditis bacteriophora</i> y <i>Heterorhabditis</i> sp., <i>nativa</i>).	60
Tabla 5.	Análisis de varianza de los sustratos de conservación	61
Tabla 6.	Análisis de varianza de tiempos de almacenamiento	61
Tabla 7.	Prueba de Tukey de los días de almacenamiento.	62
Tabla 8.	Análisis de varianza de las temperaturas (12°C y 27°C)	62
Tabla 9.	Prueba de Correlación de Pearson	63

Índice Figuras

Figura 1.	Ciclo de vida de los nematodos entomopatógenos (NE'S)	25
Figura 2.	Establecimiento de la cría de la polilla de la cera (<i>Galleria mellonella</i>)	27
Figura 3.	Reproducción de nematodos entomopatógenos	28
Figura 4.	Diseño de la investigación	35
Figura 5.	Crianza de <i>Galleria mellonella</i>	36
Figura 6.	Modo de inoculación de los nematodos entomopatógenos sobre larvas del último instar de <i>Galleria mellonella</i>	38
Figura 7.	Diseño de trampa White modificada	39
Figura 8.	Ubicación geográfica del lugar de muestreo del Caserío Montegrande – Reque	41
Figura 9.	Procedimiento de la conservación en suelo	43
Figura 10.	Evaluación de la conservación en suelo	45
Figura 11.	Procedimiento de la conservación en agar	47
Figura 12.	Evaluación de la conservación en agar	49
Figura 13.	Procedimiento de la conservación en esponja	51
Figura 14.	Mortalidad de larvas de <i>Galleria mellonella</i> infestadas por <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> , en suelo	57
Figura 15.	Mortalidad de larvas de <i>Galleria mellonella</i> infestadas por <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> , en agar	57
Figura 16.	Mortalidad de larvas de <i>Galleria mellonella</i> infestadas por <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> , en esponja	58
Figura 17.	Mortalidad de larvas de <i>Galleria mellonella</i> infestadas por <i>Heterorhabditis</i> sp., nativa en suelo	58

Figura 18.	Mortalidad de larvas de <i>Galleria mellonella</i> infestadas por <i>Heterorhabditis</i> sp., nativa en agar	59
Figura 19.	Mortalidad de larvas de <i>Galleria mellonella</i> infestadas por <i>Heterorhabditis</i> sp., nativa en esponja	59
Figura 20.	Cámara húmeda A. <i>Heterorhabditis</i> sp., nativa y <i>B. Heterorhabditis bacteriophora</i>	64
Figura 21.	Disección de larva muerta por <i>Heterorhabditis</i> sp., nativa y <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> , en laboratorio- INIA	64

Resumen

Una alternativa ecológica son los nematodos entomopatógenos que tienen gran potencial para controlar plagas de insectos de importancia agrícola, por tal motivo es de suma importancia mejorar su supervivencia en condiciones de almacenamiento, dependiendo de factores como temperatura, concentración y tiempo para determinar su viabilidad. El objetivo de este trabajo fue evaluar la conservación de los nematodos entomopatógenos (*Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp., *nativa*) en tres sustratos a diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento en laboratorio. Se utilizan los sustratos: esponja, agar y suelo a temperatura de 12°C y 27°C y cuatro tiempos de almacenamiento (15, 30, 45 y 60 días). Se realizaron cuatro ensayos y en cada ensayo se utilizaron 180 larvas de *Galleria mellonella* para *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp., *nativa* respectivamente. Se evaluó mediante el porcentaje de mortalidad de larvas de *Galleria mellonella* por los nematodos entomopatógenos. Se realizó el análisis estadístico de los tres sustratos evaluados, mostrando ser similares significativamente; mientras que en el tiempo de almacenamiento los 15 y 30 días, mostraron gran diferencia significativa con respecto a los 45 y 60 días; en la temperatura también presentó diferencia significativa aunque mínima.

Palabras claves: controladores, plagas, entomopatógeno, sustrato, conservación, acondicionamiento, estadio.

Abstract

An ecological alternative is entomopathogenic nematodes have great potential to control insect pests of agricultural importance, for this reason it is important to improve survival in storage, depending on factors such as temperature, concentration and time to determine their viability. The aim of this study was to evaluate the conservation of entomopathogenic nematodes (*Heterorhabditis bacteriophora* and *Heterorhabditis* sp., *native*) on three substrates at different times and storage temperatures in the laboratory. substrates are used : sponge , agar and soil temperature of 12°C and 27°C and four storage times (15 , 30,45 and 60 days). Four trials were conducted and in each trial 180 *Galleria mellonella* larvae *Heterorhabditis bacteriophora* and *Heterorhabditis* for used sp., *native* respectively. It was assessed by the percentage mortality of larvae *Galleria mellonella* by entomopathogenic nematodes. statistical analysis of the three substrates evaluated performed significantly showing be similar , while the storage time of 15 and 30 days, showed great significant difference at 45 and 60 days ; in temperature also it presented significant but minimal difference.

Keywords: drivers, pests, entomopathogenic, substrate, storage, conditioning, stage.

I. INTRODUCCIÓN

Uno de los grandes problemas que afronta la humanidad es el manejo de plagas agrícolas. Según Lacely y Goettel (1995), los costos ambientales han sido altos; la agricultura intensiva tiene como consecuencia la pérdida continúa de ecosistemas naturales, uso incrementado de plaguicidas, la contaminación del agua y otros tipos de contaminación ambiental. La aplicación de insecticidas se hace de manera poco responsable ambientalmente hablando, incrementándose en más de mil veces sus costosas utilidades ($4,1 \times 10^9$ dólares anuales en EUA); no obstante, la destrucción de alimento y fibras por las plagas continúa en un 37 % y las pérdidas por insectos casi se han duplicado (Pimentel *et al.*, 1991).

Frente a ello, a nivel del mundo diversas instituciones están utilizando una serie de métodos ecológicos dentro de un Programa Integrado de Plagas como es el empleo del control biológico, lo que ha generado efectividad y menor uso de los plaguicidas; este control de plagas, constituye una alternativa viable, sostenible y posible para países en vías de desarrollo (Alatorre y Guzmán, 1999).

Entre los agentes potenciales que han mostrado ser excelentes controladores biológicos de plagas tenemos: los nematodos entomopatógenos de las Familias *Steinernematidae* y *Heterorhabditidae* que pertenecen al Orden Rhabditida, son usados en cultivos agrícolas, en los insectos que poseen un estadio susceptible en el suelo o en la superficie del mismo (Kaya, 1993).

Sánchez, Cortez y Cristóbal en el 2012, utilizaron el nematodo *Heterorhabditis indica* en el manejo de gallina ciega (Col: *Melolonthidae*) los ensayos se realizaron en larvas y adultos recolectadas en cultivos de maíz, se aplicó una dosis de 2 500 nemátodos·ml⁻¹ con una viabilidad superior al 95% y una larva del tercer estadio de *Phyllophaga spp.* con la dosis evaluada (2 500 nematodos ml⁻¹) donde la mayor

mortalidad registrada después de cinco días de incubación fue de 40% - 46% para los tratamientos suelo y composta, el tiempo en que se alcanzó la máxima mortalidad. Los adultos de gallina ciega fueron más susceptibles al nematodo *H. indica* con un 99%.

Estos nematodos poseen una combinación casi única de atributos deseables; no obstante, poseen también limitaciones, como la necesidad de llevar a cabo aplicaciones múltiples y con altas dosis, insuficiente capacitación de extensionistas y productores, así como escasa divulgación acerca de las bondades y del uso correcto de estos organismos en el manejo de plagas. (Salas, 2002).

La supervivencia de los nematodos entomopatógenos en condiciones de laboratorio es baja; debido a que existen dificultades de almacenamiento que constituyen uno de los principales obstáculos para expandir, el uso de nematodos entomopatógenos como: bioinsecticidas, la alta demanda de oxígeno, la sensibilidad de algunas especies a las variaciones de temperatura, la susceptibilidad a contaminantes microbianos, y la toxicidad de los agentes antimicrobianos son factores que influyen en la calidad de almacenamiento del nematodo en agua (Grewal, 2000).

Sánchez en el 2001, realizó estudios para conocer el potencial del nematodo *Heterorhabditis indica* en el control de *Curculionidae aguacatae*, utilizando larvas. Se estimó la mejor dosis y el tiempo en que murió el 50% de las larvas (DL50). Los bioensayos dentro de ramas incluyeron cuatro estrategias de aplicación: savia “baba” de nopal, grenetina, agua, y agua más cubierta de plástico.

Hussein, Adel y Gelbic en el 2012, reportaron que debido al calor causado por el verano. Utilizaron al nematodo entomopatógeno *Steinernema feltei* cepa Ustinov Rusia, para el control de larvas de escarabajos *Leptinotarsa decemlineata* (Say.) (Coleóptera: *Chrysomelidae*) en el follaje de papa, las aplicaciones fueron en

formulaciones de agar 4%, 2%, 1% y 0,5%. Los mejores resultados para viabilidad fue la concentración de 1% a comparación de otras concentraciones y los resultados para la eficacia en laboratorio e invernadero fue la concentración al 1% debido a que se encontró mayor número de nematodos adultos en el interior de las larvas muertas en comparación con las otras concentraciones.

En el Perú son escasas las investigaciones sobre tipos de conservación de nematodos; la metodología más usada para conservación es la esponja, debido a que el número de los nematodos oscila de 500 a 1000 JI/cm² y que normalmente en una sola lámina se inoculan de 5 a 25 x10⁶. Estas láminas son introducidas después en bolsas plásticas y los nematodos en estas esponjas pueden ser almacenados de 1 a 3 meses a una temperatura entre 5°C y 10°C. (Grewall, 1998).

En este ensayo se trabajó con tres sustratos diferentes para extender la supervivencia de nematodos entomopatógenos (*Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp., *nativa*), bajo condiciones de laboratorio.

La finalidad fue mejorar la forma de conservación de los nematodos entomopatógenos (*Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp., *nativa*) en laboratorio, contribuyendo en su producción masiva para ser utilizado como alternativa ecológica para el control biológico de plagas, planteándose los siguientes objetivos:

Objetivo general

Evaluar la conservación de los nematodos entomopatógenos (*Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp., *nativa*) en tres sustratos a diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento en laboratorio.

Objetivos específicos

- Calcular la mortalidad de larvas de *Galleria mellonella* por nematodos entomopatógenos (*Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp., *nativa*) en tres sustratos de conservación (suelo, agar y esponja).
- Calcular la mortalidad de larvas de *Galleria mellonella* por nematodos entomopatógenos (*Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp., *nativa*) a diferentes tiempos de almacenamiento y dos temperaturas.

II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Entre las alternativas del manejo de plagas más amigables con el ambiente se cuenta hoy en día con los nematodos entomopatógenos, es decir, microorganismos que causan enfermedades a los insectos, como son: bacterias, hongos, virus y nematodos. Siendo los nematodos, los organismos que en los últimos años han cobrado gran importancia por su facilidad de ser aplicado en el suelo, su alta virulencia, patogenicidad y su relativa facilidad para ser multiplicados en forma masiva y comercializados (Larriva, 2002).

En las últimas décadas los NEP (Nematodos entomopatógenos) son considerados, como agentes para el control de plagas, ante las actuales restricciones por el uso de insecticidas, constituyéndose como una herramienta efectiva para incorporar en programas MIP (Ehlers, 1996). De acuerdo con Molina y López (2003) los NEP presentan alta potencialidad para control de plagas del suelo y de hábitos crípticos como *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae); sin embargo, factores abióticos como la humedad pueden disminuir su eficiencia. Así mismo varios factores afectan también la supervivencia del juvenil infectante (JI) como son la radiación ultravioleta, la textura del suelo, el pH y la temperatura extremos en campo (Georgis y Manweiler, 1994).

Sánchez en el 2001, realizó estudios para conocer el potencial del nematodo *Heterorhabditis indica* en el control de *Curculionidae aguacatae*, bioensayos con larvas, fuera y dentro de ramas fueron implementados. Fuera de ramas se evaluaron cuatro concentraciones: 1% (2 500 nematodos m⁻¹); 0,1% (250 nematodos m⁻¹); 0,01% (25 nematodos m⁻¹) y 0,001% (2.5 nematodos m⁻¹). Se estimó la mejor dosis y el tiempo en que murió el 50% de las larvas (DL50). Los bioensayos dentro de ramas

incluyeron cuatro estrategias de aplicación: savia “baba” de nopal, grenetina, agua, y agua más cubierta de plástico. Tiras de esponja de 5 x 6 cm fueron empapadas con una suspensión de nematodos a concentraciones de 500 nematodos ml⁻¹ más el tratamiento correspondiente. Las ramas fueron envueltas con las esponjas y se incubaron a 25 ± 1°C durante 15 días.

Según Soler *et al.*, en el 2003, probaron que los nematodos formulados pueden ser estables durante 8 meses en envases cerrados a 4°C y durante 3-4 meses a temperatura ambiente. No obstante, para su aplicación se requiere de la adición previa de citrato de sodio, con el objetivo de liberar los nematodos de la matriz del gel de alginato, lo cual significa tiempo consumido en el paso de extracción. También otra de las formas de inmovilizar a los nematodos para preservar sus energías lipídicas, es en capas pseudoplásticas, a través de agentes como las gomas rhansana y xanthana.

Otro paso significativo en la evolución de la producción de nematodos, fue la transición del cultivo sólido a la técnica de fermentación líquida. Con este método, aproximadamente disminuyen los costos de producción hasta una capacidad de 50 x 10¹² Juveniles/ml. Actualmente se tienen producciones consistentes de *S. carpocapsae* y *S. feltiae* en fermentadores de 15 000 - 80 000 L con rendimientos de hasta 100 000 Juveniles/cm³. A pesar de haberse producido *Heterorhabditis* por esta vía, los resultados no son tan consistentes como con *Steinernema*, especialmente en grandes fermentadores (7 500 - 80 000 L). Por esta razón, los heterorhabditidos se reproducen exitosamente por cultivo sólido.

Chen y Glazer en el 2005, mencionaron que las soluciones hiperosmóticas se utilizan para deshidratar e inmovilizar parcialmente a los nematodos, evitando el movimiento que desperdiciaría energía. Estas soluciones se acoplan en la encapsulación en gránulos de alginato para conservar el agua remanente en los

nematodos, logra que estos sobrevivieran en buenas condiciones por seis meses, al ser almacenados a temperatura ambiente y al 100% de humedad relativa, con una sobrevivencia de 96% -100% a 23°C, comparados con 10% - 15% para los nematodos almacenados en agua sola o en gránulos de alginato sin tratamiento. Después de seis meses de almacenamiento la tasa de infección de los nematodos formulados de esta manera fue del 23%, comparable con los nematodos frescos lo cual resultó mayor que el 2% de infectividad de los nematodos formulados sólo con gránulos de alginato y almacenados durante el mismo período.

Chica en el 2010, desarrolló su investigación en dos etapas: en la primera etapa; evaluó tres medios in vitro (papa-levadura-camote y riñón de puerco en “tubo inclinado”, así también una dieta a base de balanceado para perros), y un medio in vivo (larvas de *Galleria melonella*), con el objetivo de obtener un sustrato eficiente para la multiplicación masiva de los nematodos entomopatógenos nativos a utilizarse para el control de *Sagalassa valida* y en la segunda etapa; se usaron tres dosis de nematodos, una baja de 750 000 nemas/palma, una dosis media de 1’500 000 nemas/palma y una alta de 2’000 000 de nemas/palma, más un testigo químico (Endosulfan 10cc/palma) y un absoluto.

En base a resultados obtenidos se concluyó lo siguiente: El mejor sustrato para multiplicar el nematodo entomopatógeno nativo y considerablemente económico, es el medio in vivo usando larvas del ultimo ínstar de la polilla de las colmenas de abeja *Galleria melonella* y que la mayor cantidad de nematodos nativos se logró obtener a los 14 días que se considera como la fecha que presentan el mayor número de generaciones de este microorganismo. Demostrando que el uso de estos microorganismos nativos son una alternativa importante a considerar e implementar en el manejo integrado de *Sagalassa valida*.

Andalo, Sousa, Molina y Moino en el 2010, evaluaron sustratos para extender la supervivencia de nematodos entomopatógenos, en suspensiones de *Heterorhabditis* sp. JPM4 y *Steinernema carpocapsae*. Todos (3000 IJ ml⁻¹) se añadieron: arena fina, arena gruesa, espuma, arcilla expandida, espuma fenólica, agar, almidón de maíz, Plantmax® y agua. Los sustratos se colocaron en placas de Petri (5 cm) y se mantuvieron a 16 ± 1°C. Evaluaciones de supervivencia se realizaron después de 30, 60, 90, 120, 150, y 180 días, con tres repeticiones. Después de 180 días, un mayor porcentaje de *S. carpocapsae* juveniles infectivos (IJs) seguían vivos en el tratamiento de la espuma (57,5%) en comparación con otros tratamientos, mientras que la arcilla expandida (28,4%), Plantmax® (9,3%) y la espuma fenólica (11%) no fueron eficaces en el mantenimiento de la tasa de supervivencia. Espuma (55,6%), arena gruesa (53,1%), y arena fina (50,6%) presentó mayor *Heterorhabditis* sp. supervivencia JPM4 IJ a 180 días. Agar (19,3%), espuma fenólica (11,6%), y Plantmax® (10,7%) tenían índices de supervivencia más bajas que el control (29,7%). El uso de un sustrato apropiado puede proporcionar una mayor supervivencia IJ.

Saénz; López y Galindo en el 2011, reportaron que la formulación implica procedimientos que permiten a los nematodos entomopatógenos reducir su actividad metabólica y entrar en un estado de deshidratación (anhidrobiosis parcial) debido a la baja humedad relativa de los agentes inertes usados como: el carbón activado, vermiculita, alginatos, caolín y poliacrilamida. Estos agentes propician un menor costo en el almacenamiento y transporte del producto, un mejor manejo y mayor vida de anaquel. Además los nematodos entomopatógenos también pueden formularse en soluciones acuosas pero esto no es muy conveniente porque deben mantenerse en refrigeración y con agitación moderada, debido a que hay un mayor riesgo de contaminación.

Sánchez, Cortez y Cristóbal en el 2012, utilizaron el nematodo *Heterorhabditis indica* en el manejo de gallina ciega (Col: *Melolonthidae*) los ensayos se realizaron en larvas y adultos recolectadas en cultivos de maíz, los ensayos con larvas se realizaron en recipientes de plástico de 5 x 6 cm, se agregaron 3cm de tipos de sustratos suelo y composta (a base de fibra de coco), se aplicó una dosis de 2500 nematodos ml^{-1} con una viabilidad superior al 95% y una larva del tercer estadio de *Phyllophaga spp.*

Se establecieron tres repeticiones con diez larvas por repetición y se incluyó un testigo sin nematodos. Los ensayos con adultos de manera similar al de las larvas, se utilizó una esponja de 0,5 cm de espesor en el fondo del recipiente. Se consideró tres repeticiones más un testigo sin nematodos, con la dosis evaluada (2 500 nemátodos $\cdot \text{ml}^{-1}$) la mayor mortalidad registrada después de cinco días de incubación fue de 46% y 40% para los tratamientos suelo y composta, el tiempo en que se alcanzó la máxima mortalidad, en el sustrato suelo se obtuvo 86 h, mientras que en composta fue a las 40 h. los adultos de gallina ciega fueron más susceptibles al nematodo *H. indica* con un 99%.

Ensayos realizados con una población de *Steinernema carpocapsae* (SCG.2) detectada sobre larvas de *Capnodis tenebrionis* L, (Col: Buprestidae) en la provincia de Sevilla; revelan que en un primer ensayo obtuvieron nematodos en cultivos sobre larvas de *C. tenebrionis* aisladas del medio natural. Los nematodos obtenidos se conservaron en formol (0,1% a 4°C – 6°C) para ser utilizados en un segundo ensayo en el que también se utilizaron individuos obtenidos después de una rehidratación del medio en el que permanecían: con este método se recuperaron del 50 al 80% de los individuos.

En el segundo ensayo se usaron las formas infectivas obtenidas a partir del primero. Para esto, se procedió a un filtrado y fueron seleccionados por su aspecto intacto y motilidad normal de ondulaciones sinusoidales; aspectos observados en un microscopio invertido (100x) tal y como ha sido realizado por Badley *et al.*, (1990). Los ensayos de mortandad y estudios de producción de nematodos se realizaron sobre estados preimaginales de *C.tenebrionis*, *Spodoptera littoralis* Hübner, *Spodoptera exigua* Hübner.

Hussein, Adel y Gelbic en el 2012, reportaron que debido al calor causado por el verano, utilizaron al nematodo entomopatógeno *Steinernema feltei* cepa Ustinov Rusia, para el control de larvas de escarabajos *Leptinotarsa decemlineata* (Say.) (Coleóptera: Chrysomelidae) en el follaje de papa, las aplicaciones fueron en formulaciones de agar 4%, 2%, 1% y 0,5% y el grupo control que fue con agua, para probar la eficacia y viabilidad de los individuos juveniles. Los mejores resultados para viabilidad fue la concentración de 1% a comparación con las otras concentraciones y los resultados para la eficacia en laboratorio e invernadero fue la concentración al 1% debido a que se encontró mayor número de nematodos adultos en el interior de las larvas muertas en comparación con las otras concentraciones.

En nuestro país se viene desarrollando la producción artesanal de nematodos entomopatógenos, teniendo un factor limitante, como es la producción masiva de nematodos, siendo difícil de obtener una forma de conservación óptima para todas las especies de nematodos por tener requerimientos específicos de humedad y oxígeno.

Lo que habitualmente se realiza es que los nematodos entomopatógenos, se almacenan en agua, ocasionando que estos, utilicen sus reservas de manera diferente, cambiando su comportamiento de locomoción y de esta forma reducen su gasto de energía y la superación de las condiciones de estrés.

III. MARCO TEÓRICO

3.1. *Nematodos Entomopatógenos*

3.1.1. *Generalidades.*

El Phylum Nematoda, es uno de los más diversos del Reino Animal. Se encuentran en ambientes en contraste y hostiles, como tundras y desiertos, desde aguas congeladas a aguas termales, ambientes marinos y de agua dulce, entre otros. Esta amplia diversidad de hábitat, permite relacionarse con otros organismos como los insectos, generándose interacciones que van desde asociaciones fortuitas o foréticas (Kaya et al., 1993; Tanada y Kaya, 1993).

De todos los nematodos conocidos como biorreguladores de insectos, los nematodos entomopatógenos de las familias *Steinernematidae* Chitwood y Chitwood, 1937 y *Heterorhabditidae* Poinar, 1976; constituyendo los de mayor relevancia (Sánchez, 2002). Los representantes de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis*, están asociados simbióticamente con bacterias patógenas de insectos que pertenecen a la Familia Enterobacteriaceae, así tenemos que *Heterorhabditis* está asociado con bacterias del género *Photorhabdus* y *Steinernema* con *Xenorhabdus* (Boemare, 2002; Montesinos, 2003).

La especie *Heterorhabditis* (Nematoda: Rhabditida) es un excelente controlador biológico para insectos del suelo (Grewal et al., 2005). El nematodo *Heterorhabditis bacteriophora* fue descrito por primera vez en 1975 como un nuevo género, la especie y la Familia (*Heterorhabditidae*) de Orden Rhabditida (Poinar, 1975) este es un entomopatógeno obligado, considerado como agente potencial de control biológico. Las hembras jóvenes pueden ser hermafroditas o normales, los

machos solo se producen en la generación de fertilización cruzada (Fernández *et al.* s.f). Este género presenta una relación simbiótica con la bacteria del genero *Photorhabdus*.

Un ejemplo del uso de los nematodos entomopatógenos, es el caso de la introducción de *Popillia japonica* Newman, 1841 en Estados Unidos, plaga que se multiplicó rápidamente, devastando árboles frutales y plantas ornamentales y que se encontró infectada con el nematodo *Steinernema glaseri* (Steiner, 1932) (Rhabditida: *Steinernematidae*) cerca de Haddonfield, New Jersey en el año 1929. Experimentos con este nematodo se realizaron en los años 30, culminando con un programa de cría masiva donde 3,6 billones de nematodos fueron liberados a través del estado de New Jersey, recuperándose larvas infectadas en 72 de 73 parcelas dos semanas después de la aplicación, registrándose un parasitismo que osciló entre 0,3% a 81% (Jackson 1993; Glaser *et al.* 1940; Glaser 1931; Glaser y Farrell 1935; Glaser y Fox 1930). Si bien, desde hace tiempo se conocen “Los nematodos entomopatógenos”, es en la última década cuando se han intensificado investigaciones para extraer estos organismos del suelo.

Los nematodos entomopatógenos reúnen atributos que les otorgan un interesante potencial como agentes de control biológico: poseen un amplio rango de insectos huéspedes, son hábiles para buscar y perseguir larvas e insectos en el suelo, causan rápida mortalidad de ellos, tienen facilidad para ser reproducidos masivamente y para ser aplicados, resultan seguros para los organismos que no son su objetivo y para el medio (Merino y France, 2009).

3.1.2. *Biología y hábitos de los Nematodos Entomopatógenos.*

Como resultado de una evolución paralela. Los nematodos entomopatógenos presentan patrones básicos de similitud en su biología (Poinar, 1990). Son parásitos obligados de insectos, invaden al hospedero y liberan una bacteria que se multiplica en el hemocele del insecto, donde posteriormente se alimentan y reproducen. El hospedero muere y los nematodos se reproducen y colonizan todo el cadáver y finalmente sale en busca de nuevos hospederos (Jaffee, 1993).

La duración del ciclo de vida de *H. bacteriophora* a 25°C, de huevo a huevo es de 96 h el desarrollo de juveniles toma un tiempo de 48 h, con la duración de cada estado de 8 a 12 h la duración y proporción de los estados de desarrollo en la población son similares en cultivos in vivo que in vitro (Zioni *et al.*, 1992). Los ciclos de vida dependen de la temperatura y no se completa a temperaturas inferiores de 10°C a 15°C o a temperaturas superiores de 35°C a 37 °C, siendo la óptima de 24°C (Nguyen y Smart, 1992).



Figura 1. Ciclo de vida de los NE's (Dirt Works, 2001)

Fuente:[http://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/4459/MEJORAMIENTO LERANCIA.pdf?sequence=1](http://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/4459/MEJORAMIENTO%20LERANCIA.pdf?sequence=1)

3.2. Producción de nematodos entomopatógenos en laboratorio de biocontroladores.

Una de las formas de reproducir los nematodos entomopatógenos en grandes cantidades es utilizando como sustrato algún insecto que sea fácil de reproducir masivamente en el laboratorio. En muchos países, así como en nuestro país, es utilizada la polilla de la cera (*Galleria mellonella*) (Lepidoptera: Pyralidae). De cada larva de polilla, se pueden obtener hasta 200 000 juveniles infectivos de nematodos entomopatógenos aproximadamente (Rosales, Rodríguez, Enríque, Puente y García, 2009).

○ Crianza de *Galleria mellonella* “Polilla de la cera”, Según Rosales et al, 2009 (Fig. 2).

A. Adultos hembras y machos son colocados en frascos de vidrio de cuatro litros (carameleros) para la cópula. Se les colocan abanicos de papel parafinado para que coloquen allí sus huevecillos, que luego serán colectados para ser colocados en un frasco con dieta nueva.

B. En un envase de plástico o vidrio bien limpio y seco, de cuatro litros de capacidad, se colocan aproximadamente 300 gramos de dieta y 0,5 gramos de huevos de *Galleria* (la colecta de huevecillos se hace con un pincel para no dañarlos).

C. Allí se dejan crecer las larvas, cuidando de refrescar la dieta agregando cada tres días miel de abeja en la superficie de la misma. Los envases deben taparse o untar los bordes con grasa de carro o vaselina, para evitar el escape de las larvas.

D. Cuando las larvas alcanzan un peso aproximado de 200 gramos están listas para ser usadas en la reproducción masiva de los nematodos.



Figura 2. Establecimiento de la cría de polilla de la cera “*Galleria mellonella*”

Fuente: <http://es.scribd.com/doc/56864785/Cria-nematodos-entomopatogenos-7#scribd>

○ ***Infestación de larvas de *Galleria mellonella*, con solución de infectivos juveniles (IJ) Según Rosales et al, 2009 (Fig. 3).***

A. Se forran envases de vidrio con papel de filtro o absorbente y se colocan dentro 100 a 150 larvas de la polilla de la cera.

B. Se seleccionan cuidadosamente las larvas muertas y se lavan con agua destilada. Se colocan en placas de Petri forradas con papel filtro y se incuban de seis a doce días.

C. Se prepara una solución con infectivos juveniles del nematodo, a partir de la cepa conservada en el laboratorio, y se añaden a los frascos sobre el papel absorbente. Los envases se tapan y se colocan en estantes o sobre mesas.

D. Al observar la emergencia de los primeros infectivos juveniles, se colocan en envases de emergencia o recolección.

E. Se mantienen bajo observación para detectar el cambio de color de las larvas de la polilla de la cera, que indica la muerte de las larvas debido al parasitismo de los nematodos.

F. Se colectan los juveniles infectivos y se colocan dentro de bolsitas de plástico junto con una esponja de goma espuma y cerradas herméticamente. Mantener en lugares frescos hasta su uso.

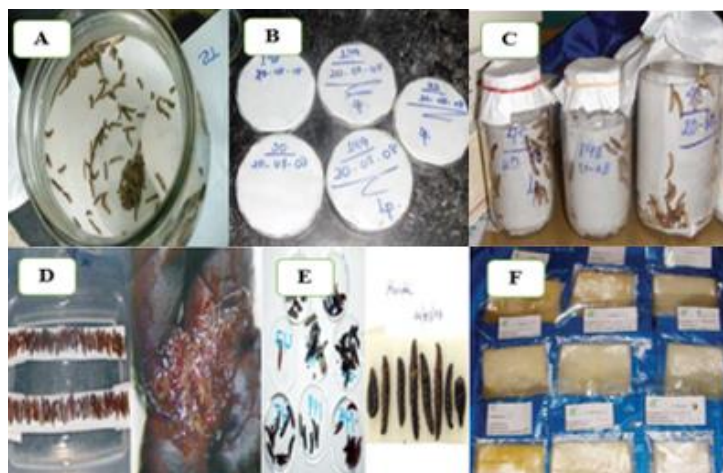


Figura 3. Reproducción de nematodos entomopatógenos

Fuente: <http://es.scribd.com/doc/56864785/Cria-nematodos-entomopatogenos-7#scribd>

3.2.1. Control Biológico con nematodos entomopatógenos.

Perrera en el 2009, evaluó la efectividad del nematodo *Heterorhabditis bacteriophora* para el control de larvas de *Phyllophaga spp.* el estudio, se dividió en dos fases: En la primera se evaluaron dos dosis de *H. bacteriophora* 2×10^8 y 4×10^8 JI's/ha y el insecticida Carbofuran 48 SC (4 L/ha) sobre la mortalidad de larvas de gallina ciega en casa malla. Se colocaron 10 larvas de gallina ciega por recipiente plástico de 5 500 cm³ de volumen que contenían semillas de maíz de 4 días de germinación, se hizo tres repeticiones por tratamiento en casa malla.

La segunda fase se realizó en campo se evaluó una dosis de *H. bacteriophora* (2×10^8 JI's/ha) y el insecticida Clorpirifos (5 L/ha), en un cultivo de lechuga con 28 días de trasplante, también se evaluó la eficiencia de la distribución de *H. bacteriophora* a través del riego por goteo. El ensayo se estableció en un lote de 90

m × 20 m, con dos tratamientos en seis parcelas de 10 × 20 m cada una. Tres parcelas fueron tratadas con *H. bacteriophora* 2×10^8 JI's/ha y tres con Clorpirifos (5 L/ha). La liberación del nematodo *H. bacteriophora* se realizó por el sistema de riego por goteo.

Naranjo; Villamil y Sáenz en el 2011, demostraron la patogenicidad de *Steinernema* sp. y *Heterorhabditis* sp. sobre ninfas y adultos de *Collaria scenica* y se determinó el efecto de diferentes concentraciones de Juveniles infectivos (JI) sobre ninfas y adultos de *Collaria scenica*. Se hicieron tres tratamientos que corresponden a *Heterorhabditis* sp. (T1), *Steinernema* sp. (T2) y un control (T3), con cinco repeticiones tres estadios del insecto y las dos especies de nematodos entomopatógenos.

Estos fueron agrupados en tres categorías y no se trabajó con el primer estadio ninfal; categoría 1: segundo y tercer estadio, categoría 2: cuarto y quinto estadio, categoría 3: adultos. En cajas Petri de 10 cm de diámetro se ubicó papel de filtro humedecido con 5 ml de agua desionizada estéril. En cada caja se agregaron 5 000 juveniles infectivos (JI) y finalmente se colocaron 10 insectos en cada una. Cada veinticuatro horas fue evaluado el porcentaje de mortalidad y sintomatología.

También se evaluó el efecto de la patogenicidad de diferentes concentraciones de JI, se evaluaron siete concentraciones experimentales para cada especie de nematodos entomopatógenos, incluyendo un control. Se utilizó un diseño factorial con 20 repeticiones, dos fases del insecto (ninfa y adulto) y las dos cepas de nematodos entomopatógenos, con igual procedimiento que el primer ensayo. Los resultados después de veinticuatro horas, se obtuvo un porcentaje de mortalidad de 75% en las ninfas inoculadas con *Steinernema* sp. y 82% a las 48 horas en las inoculadas con *Heterorhabditis* sp. a las cuarenta y ocho horas, se presentó 100%

de mortalidad en los individuos (adultos y ninfas) tratados con *Steinernema* sp., mientras que la totalidad de individuos tratados con *Heterorhabditis* sp. murieron a las setenta y dos horas. En contraste, el porcentaje de mortalidad en el tratamiento control a las noventa y dos horas, no superó el 12%.

Batalla, Mortón y García en el 2010, apreciaron la susceptibilidad de larvas y pupas de *Tuta absoluta* a 3 especies de nematodos entomopatógenos (*Steinernema carpocapsae*, *S. feltiae* y *Heterorhabditis bacteriophora*) en condiciones de laboratorio e invernadero, en cada placa Petri se agregó 23 g de arena estéril con 10 % de agua, se utilizaron dosis de nematodos de 25 y 50 ij/cm² (594 y 1188 ij por placa) donde se colocó una larva y pupa, en otro experimento en las placas Petri se colocó hojas infectadas con 1 a 7 larvas, a las cuales se les roció dos veces con 5 ml de solución de unos 1000 ij/ml. En invernadero se utilizaron 10 plantas de tomate en macetas para cada especie de nematodo entomopatógeno, donde se colocaron 10 larvas por planta.

En laboratorio los más virulentos fueron *S. feltiae* y *H. bacteriophora* con el 100% de mortalidad, en invernadero los más eficaces fueron *S. feltiae* y *H. bacteriophora* con 95% de mortalidad.

3.3. Conservación de nematodos entomopatógenos

○ Conservación en suelo

Los nematodos, específicamente los infectivos juveniles 3 (Ij3), son habitantes del suelo. La actividad de los nematodos entomopatógenos es fuertemente influida por las características del suelo, tales como: pH, conductividad eléctrica (CE), densidad aparente, densidad real, y materia orgánica (Sánchez *et al*, 2012); sin embargo en un estudio realizado en Cuba se comparó también el comportamiento de una población

de *H. bacteriophora* que se mantuvo durante 3 años en reproducción continua sobre *G. mellonella* en laboratorio, con un aislado de campo mantenido en macetas con el suelo original mostrando igual patogenicidad sobre larvas de *G. mellonella* que la cepa de laboratorio.

- ***Conservación en agar***

Los nematodos entomopatógenos se han cultivado en placas Petri utilizando diferentes medios: agar (Ehlers, 2001). Hussein et al., 2012. , aplicaron formulaciones de agar en polvo; preparado en 40, 20, 10 y 5 g/L (es decir 4%, 2 %, 1% y 0,5 %); siendo el más adecuado la concentración de 1% en comparación con una aplicación de control de los nematodos en agua para la supervivencia de los nematodos.

La solución de nematodos en agar fue utilizada para mostrar la eficacia de los nematodos en pruebas de extensión tanto en laboratorio como en invernadero. La formulación en agar mejora significativamente la eficacia mediante el aumento de la supervivencia de nematodos, la reducción de la desecación en comparación con formulación a base de agua (Gelbic, 2012).

- ***Conservación en esponja***

Grewal en 1998 prueba la conservación de nematodos con esponja, Estas esponjas fueron de polieter poliuretano. Planteó que el número de los nematodos en esponjas oscila de 500 a 1000 JI/cm² y que normalmente en una sola lámina se inoculan de 5 a 25 x10⁶. Estas láminas son introducidas después en bolsas plásticas y los nematodos en estas esponjas pueden ser almacenados de 1 a 3 meses a una temperatura entre 5°C y 10°C. Para preparar el producto a aplicar en el campo las esponjas se colocan en agua y los nematodos son removidos.

Las esponjas permiten el intercambio gaseoso y mantiene un ambiente favorable para los nematodos, lo que facilita su conservación siempre que éstos tengan reservas suficientes de lípidos (Bedding, 1984; 1986). Este método de formulación resulta conveniente para las aplicaciones a pequeña escala (Grewal., 1998).

- ***Influencia del tiempo y temperatura en el desarrollo y conservación de los nematodos entomopatógenos***

Varios factores afectan también la supervivencia del juvenil infectivo (JI) como son la radiación ultravioleta, la textura del suelo, el pH y la temperatura extremos en campo (Georgis y Manweiler 1994). En general la actividad térmica en campo de NEP steinernemátidos se encuentra entre 3°C a 14°C y para heterorhabditidos, entre 10°C a 16°C (Molineux, 1985). Temperaturas sobre 30°C o bajo 0°C afectan negativamente la persistencia de NEP, pero depende de las especies de NEP y la región geográfica de origen (Smits, 1996). Por otra parte, Kaya y Stock (1997) afirman que casi todas las especies de NEP son activas a temperatura ambiente ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) y en condiciones de almacenamiento nematodos steinernemátidos se conservan mejor a temperaturas entre 8 a 15°C, sobreviviendo de 6 a 9 meses; nematodos heterorhabdítidos sobre las mismas condiciones, sobreviven por 3 a 4 meses. Con respecto a concentración de NEPs en almacenamiento afirman que bajas concentraciones entre 1000 a 2000 JI/ml son ideales.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Área de estudio

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Biocontroladores perteneciente al Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) de la Estación Experimental “Vista Florida” carretera Ferreñafe km 8 - Chiclayo, las coordenadas geográficas del INIA son: latitud sur: 06°43'34" ,longitud oeste: 79°46'49 y altitud: 30 m.s.n.m.

4.2. Materiales y métodos

El material biológico estuvo conformado por muestras de *Galleria mellonella* muertas, por *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp., nativa.

4.2.1. Población y muestra de estudio.

Se consideró como población la solución madre de *Heterorhabditis bacteriophora* (10 330 ml) y *Heterorhabditis* sp., nativa (12 153 ml) criadas en las larvas de *Galleria mellonella*, en el laboratorio de Biocontroladores – Instituto de Innovación Agraria (INIA) Ferreñafe – Chiclayo.

La muestra, estuvo conformada por diez larvas de *Galleria mellonella* expuestas a tres sustratos (Suelo, Agar Nutritivo y Esponja) dos temperaturas (27°C y 12°C) y cuatro tiempos de almacenamiento (15, 30, 45 y 60 días); que contenían solución de nematodos entomopatógenos. De cada sustrato se obtuvieron 48 muestras, siendo un total de 144 unidades experimentales de los tres sustratos procesados (Tabla 1 y Fig. 4).

4.2.2. *Diseño del proceso de investigación de los 3 sustratos que se procesaron.*

En la presente investigación se utilizaron 3 sustratos para determinar qué forma de conservación es la más adecuada; se empleó 24 kg de suelo procedente del Distrito de Reque (Caserío Montegrande), 2 gr de Agar Nutritivo y se cortaron 48 esponjas de 3 cm²; 2 temperaturas y cuatro tiempos de almacenamiento (Fig. 4). Se realizó la producción de nemátodos entomopatógenos de *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp., nativa, cuya solución madre fueron donadas por el Laboratorio de Biocontroladores -INIA. Paralelamente se realizó el acondicionamiento de huevos de *Galleria mellonella* para su posterior crianza.

Tabla 1. *Tratamientos de los tres sustratos (suelo, agar nutritivo y esponja) con tres repeticiones a dos temperaturas y cuatro tiempos de almacenamiento.*

Tratamiento	Repeticiones	Temperatura		Tiempo			
		12°C ± 3	27°C ± 3	15 días	30 días	45 días	60 días
Esponja	Control	5 ml H ₂ O destilada	5 ml H ₂ O destilada	5 ml H ₂ O destilada	5 ml H ₂ O destilada	5 ml H ₂ O destilada	5 ml H ₂ O destilada
	Rep n° 1						
	Rep n° 2	10,000 NEP en 5ml	10,000 NEP en 5 ml	10,000 NEP en 5ml	10,000 NEP en 5ml	10,000 NEP en 5ml	10,000 NEP en 5ml
	Rep n° 3						
Agar	Control	5 ml H ₂ O destilada	5 ml H ₂ O destilada	5 ml H ₂ O destilada	5 ml H ₂ O destilada	5 ml H ₂ O destilada	5 ml H ₂ O destilada
	Rep n° 1						
	Rep n° 2	10,000 NEP en 5ml	10,000 NEP en 5ml	10,000 NEP en 5ml	10,000 NEP en 5ml	10,000 NEP en 5ml	10,000 NEP en 5ml
	Rep n° 3						
Suelo	Control	5 ml H ₂ O destilada	5 ml H ₂ O destilada	5 ml H ₂ O destilada	5 ml H ₂ O destilada	5 ml H ₂ O destilada	5 ml H ₂ O destilada
	Rep n° 1						
	Rep n° 2	10,000 NEP en 5ml	10,000 NEP en 5ml	10,000 NEP en 5ml	10,000 NEP en 5ml	10,000 NEP en 5ml	10,000 NEP en 5ml
	Rep n° 3						

Nep: nemátodos entomopatógenos (*Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp., nativa).

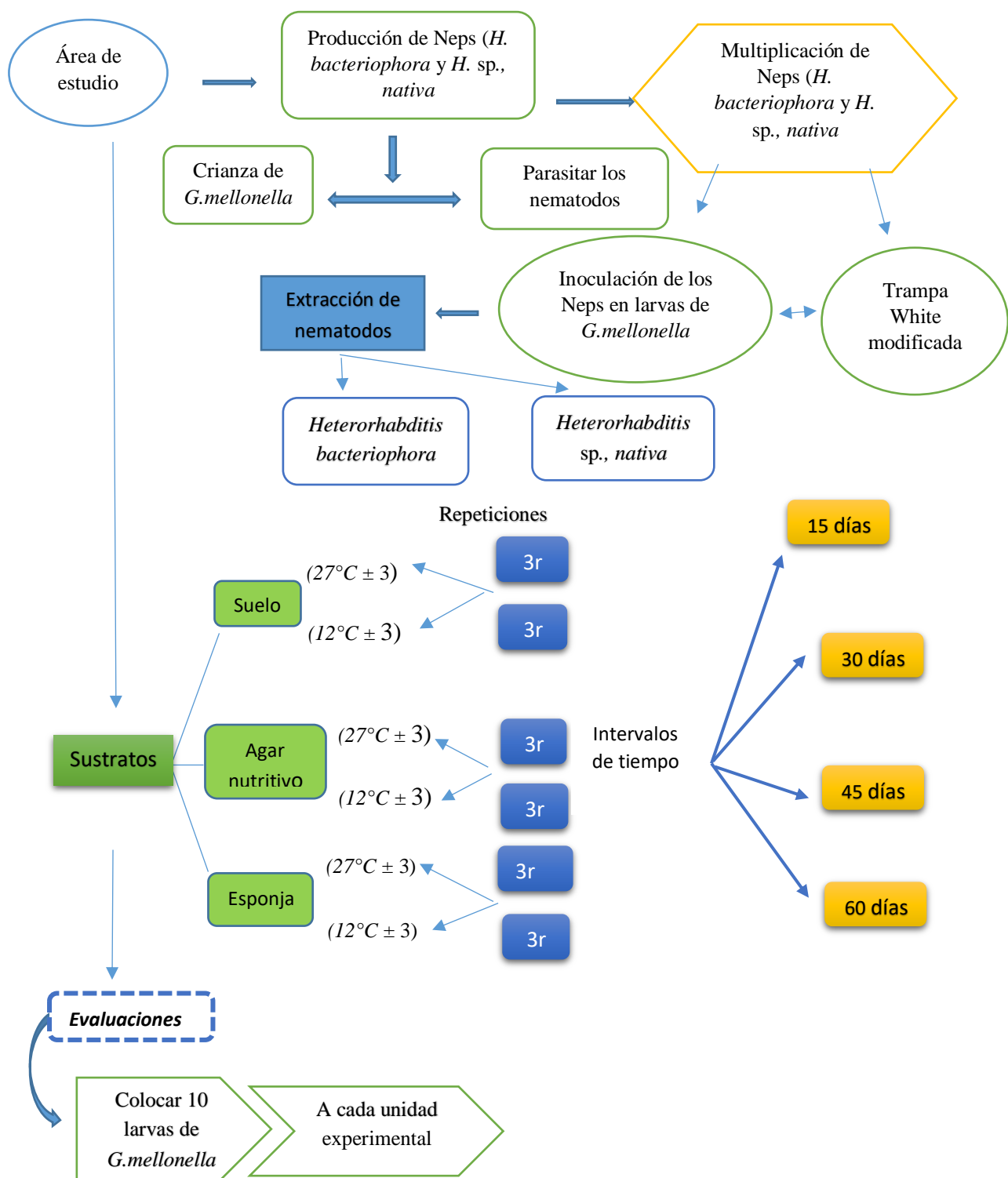


Figura 4. Diseño del proceso de investigación de los 3 sustratos, 2 temperaturas y 4 tiempos de almacenamiento

Fuente: Elaboración propia

4.2.3. Crianza de *Galleria mellonella* L. (*Lepidóptero: Pyralidae*)

Se realizó la crianza de *Galleria mellonella* “polilla de la cera” con el propósito de disponer de larvas para el aislamiento y multiplicación de los nematodos entomopatógenos, se utilizó la técnica modificada de producción en masa de Dutky, Thompson y Cantwell (1962).

Los adultos se mantuvieron en recipientes de plástico tapados con tela agujereada que permite la ovoposición de los adultos de *G. mellonella*, sobre la tela se coloca una hoja de papel en donde ovipositaron. Estos huevos fueron colocados en un taper de plástico que contenía polen, el tiempo de eclosión fue de 6 a 10 días, después de 15 días se retiraron y se colocaron a otro taper que contenía otra dieta que es a base de Ricocan, salvado de trigo y miel en la proporción de 2:1:2. Los estadios larvales son ocho, estos los realiza entre 25 y 30 días aproximadamente y la prepupa forma un cocón duro del cual emerge el adulto en aproximadamente ocho días su ciclo biológico duró aproximadamente 45 días (Figura 5). El ambiente de cría registró 25°C y 75% de humedad relativa.



Figura 5. Crianza de *G. mellonella*. (A) taper con adultos de *G. mellonella* para la oviposición. (B) taper con polen y huevecillos. (C) larvas de último estadio con dieta a base de ricocan, salvado de trigo y miel de abeja.

4.2.4. Producción y multiplicación de nematodos entomopatógenos infectivos juveniles (IJ) en el Laboratorio de Biocontroladores del Instituto Nacional de Innovación Agraria Estación Experimental “Vista Florida” – Lambayeque.

Para la producción de infectivos juveniles se siguió la metodología de producción in vivo: Córdova y Pérez (2010).

La producción de nematodos entomopatógenos se realizó en el laboratorio, utilizando como hospedero *Galleria mellonella* “Polilla de la cera”, que nos permitió obtener grandes cantidades del tercer estadio de nematodos juveniles (estado infectivo). Las larvas de *Galleria mellonella* que se utilizaron para parasitar con los nematodos de las especies: *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp., *nativa*, fueron del último estadio. Después de 15 días de infestación, se logró cosechar infectivos juveniles (IJ).

○ **Multiplicación de los nematodos entomopatógenos (*Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp., *nativa*)**

Heterorhabditis bacteriophora, fue procedente del Programa Nacional de Control Biológico del SENASA, facilitados por la Estación experimental “Vista Florida” INIA – Ferreñafe. El nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis* sp., *nativa* aislado del Distrito de Reque, Provincia de Chiclayo, fue identificado por Córdova y Pérez en el 2010. Para confirmar estas especies, se utilizaron larvas del último instar de *Galleria mellonella* que cuando estuvieron muertas por *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp., *nativa* se tornaron de color rojo, púrpura, naranja o algunos color marrón. (Kaya y Stock, 1997).

Siguiendo la metodología de Kaya (1990) con algunas modificaciones, se realizó la multiplicación de los nematodos, la cual consistió en inocular 4000 infectivos juveniles en un taper plástico (15 cm de largo x 8 cm de ancho) provisto de papel absorbente sobre 200 larvas de *Galleria mellonella* del último estadio. De esta manera se estableció una proporción de 20 nematodos / larva. Posteriormente el taper fue tapado, se incubó por unos 4 días aproximadamente.

Transcurridos los cuatro días después de la muerte de las larvas de *Galleria mellonella* causada a los nematodos, se colocaron en trampas White modificada y se incubaron a 20°C hasta la emergencia de infectivos juveniles (Kaya & Stock, 1997)

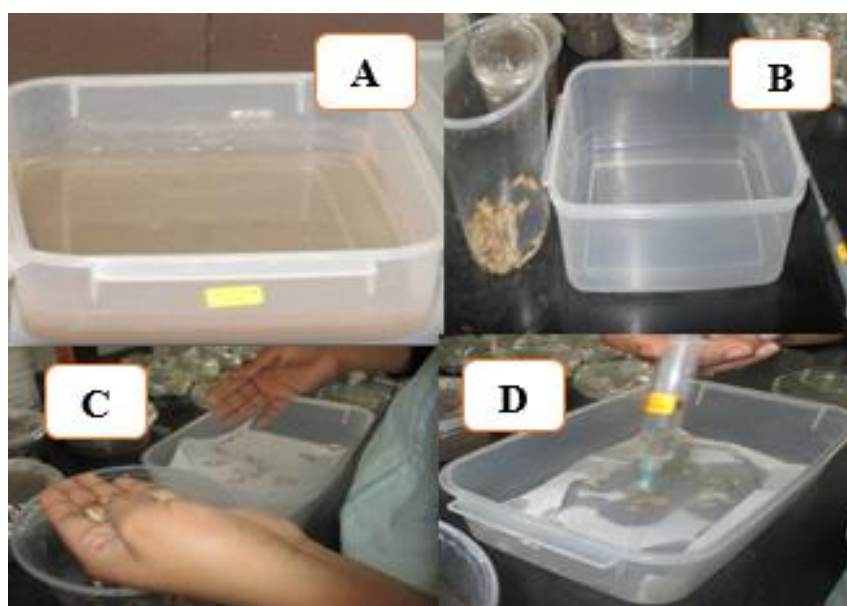


Figura 6. Multiplicación de nematodos entomopatógenos sobre larvas del último instar de *Galleria mellonella*: A) Solución de nematodos entomopatógenos B) material estéril, C) conteo de larvas y D) Inoculación de la solución de los nematodos entomopatógenos.

Los nematodos que emergieron de la trampa, se cosecharon por siete días cambiando diariamente el agua destilada de la trampa White. La emergencia de los infectivos juveniles varió de acuerdo a la cepa aislada del nematodo

entomopatógeno; para el caso de *Heterorhabditis bacteriophora* fue de 13 – 15 días, en cambio para *Heterorhabditis* sp., *nativa* fue de 9 – 11 días. Los juveniles infectivos migraron del cadáver de la larva al agua debido al higrotropismo positivo que poseen (Stock, 1992). En todos los experimentos se usaron nematodos de menos de 15 días de emergidos.

Es importante tener en cuenta que al momento de efectuar las aplicaciones de nematodos entomopatógenos, no se debe trabajar con soluciones tan viejas (las que tienen más de 30 días), ya que tendríamos más probabilidades de trabajar con nematodos muertos.

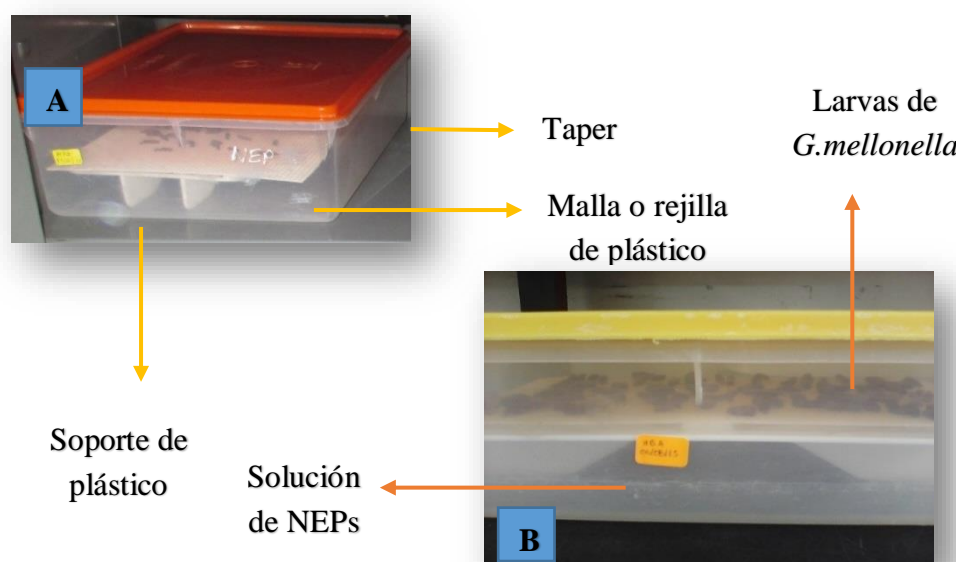


Figura 7. Diseño de Trampa White modificada. (A) Partes de la Trampa White modificada, vista frontal. (B) Larvas de *Galleria mellonella* infectadas por NEPs del género *Heterorhabditis* vista desde la parte superior de la Trampa White modificada.

4.2.5. *Cuantificación de nematodos entomopatógenos*

Para el conteo de nematodos se utiliza el método de la dilución volumétrica de (Woodring y Kaya, 1988). Se colocó con una micropipeta 10 µl de la suspensión inicial en una placa de Petri (5 cm de diámetro) rayada o dividida, y se efectuó el conteo directo de los nematodos al estereoscopio. Este procedimiento se repitió tres veces. La concentración de nematodos se determinó mediante la siguiente formula:

$$A = V \cdot a / v$$

Donde:

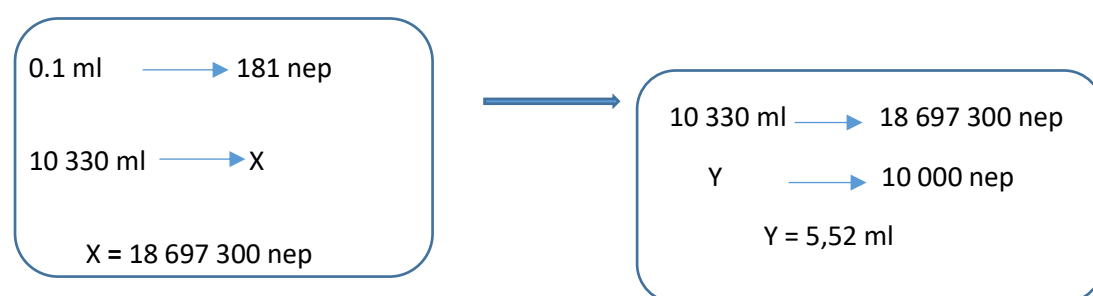
A = número de nematodos en la solución

a = número de nematodos en la muestra

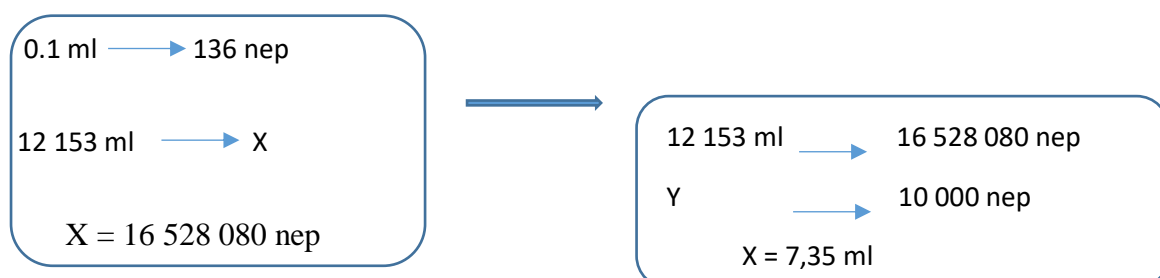
V = volumen de la solución

v = volumen de la muestra

Para *Heterorhabditis bacteriophora*



Para *Heterorhabditis* sp., *nativa*



4.2.6. Conservación de nematodos entomopatógenos (*Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp., nativa) en base a tres sustratos, dos temperaturas y cuatro tiempos de almacenamiento.

○ **Conservación en sustrato suelo**

La muestra de suelo se tomó en el Distrito de Reque (Caserío Montegrande); se escogió esta zona por ser fértil y muy productiva, pues la mayor parte de los terrenos de este caserío son destinados a la agricultura. Colectamos 24 kg de suelo por el método de cuarteo, empleando una palana para la toma de muestra; una vez obtenida la muestra, se situó en un lugar determinado y al instante procedimos a mezclar.

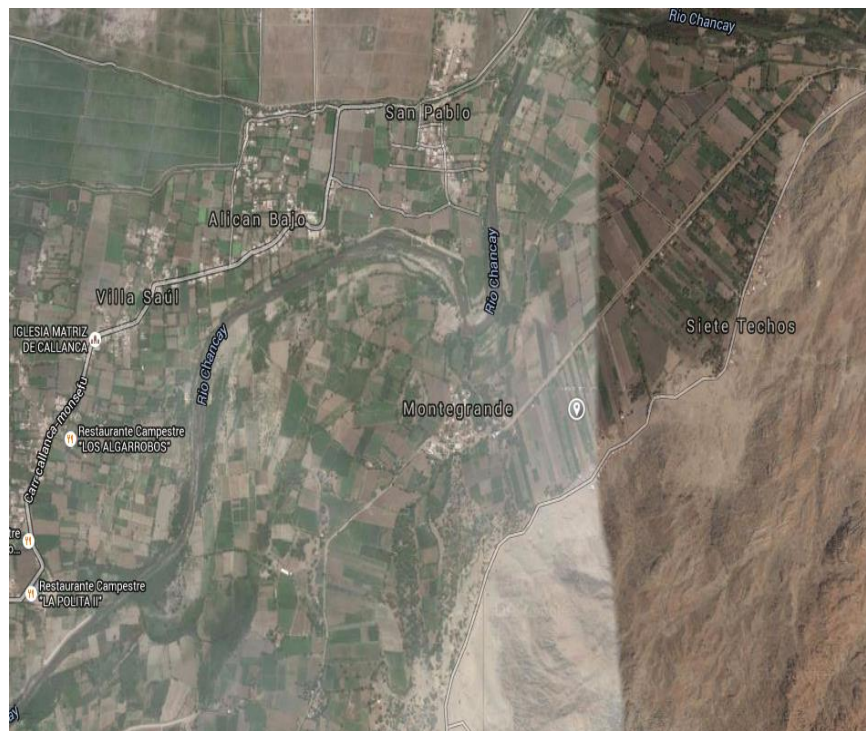


Figura 8. Ubicación geográfica del lugar de muestreo del Caserío Montegrande – Reque. Lat.: -6.839853, Lon.: -79.785912

Tomada de: <https://www.google.com.pe/maps/@-6.8395339,-79.7952246,3786m/data=!3m1!1e3>

La muestra, fue debidamente triturada para ser tamizada y obtener una muestra más accesible a ser procesada. Realizado esto, se autoclavó el suelo en vasos de precipitación por un tiempo de 2 horas a 120°C.

Pasado ese tiempo, el suelo ya estéril se colocó en bandejas de plástico (30 cm de largo x 25 cm de ancho) para tener facilidad de humedecer el suelo de forma uniforme, luego se procedió a colocar 500 gr de suelo en tapers de plástico, la cantidad de tapers utilizados fueron 24 tapers para *Heterorhabditis bacteriophora* y 24 tapers para *Heterorhabditis* sp., *nativa* (Figura 9).

El cálculo de la cantidad de nematodos entomopatógenos (*Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp., *nativa*) se realizó por el método de dilución volumétrica 10000 nematodos/cm². Inmediatamente se inoculó 5,52 ml de la solución madre en *Heterorhabditis bacteriophora* y 7,35 ml en *Heterorhabditis* sp., *nativa* en cada una de las unidades experimentales. Después de inocular, las unidades experimentales fueron selladas con parafilm y marcadas según la especie, temperatura y tiempo de almacenamiento.

Estas muestras se acondicionaron a temperatura de refrigeración (12°C ± 3) y temperatura ambiente (27°C ± 3) en tiempos de almacenamiento de 15, 30,45 y 60 días (Figura 9).

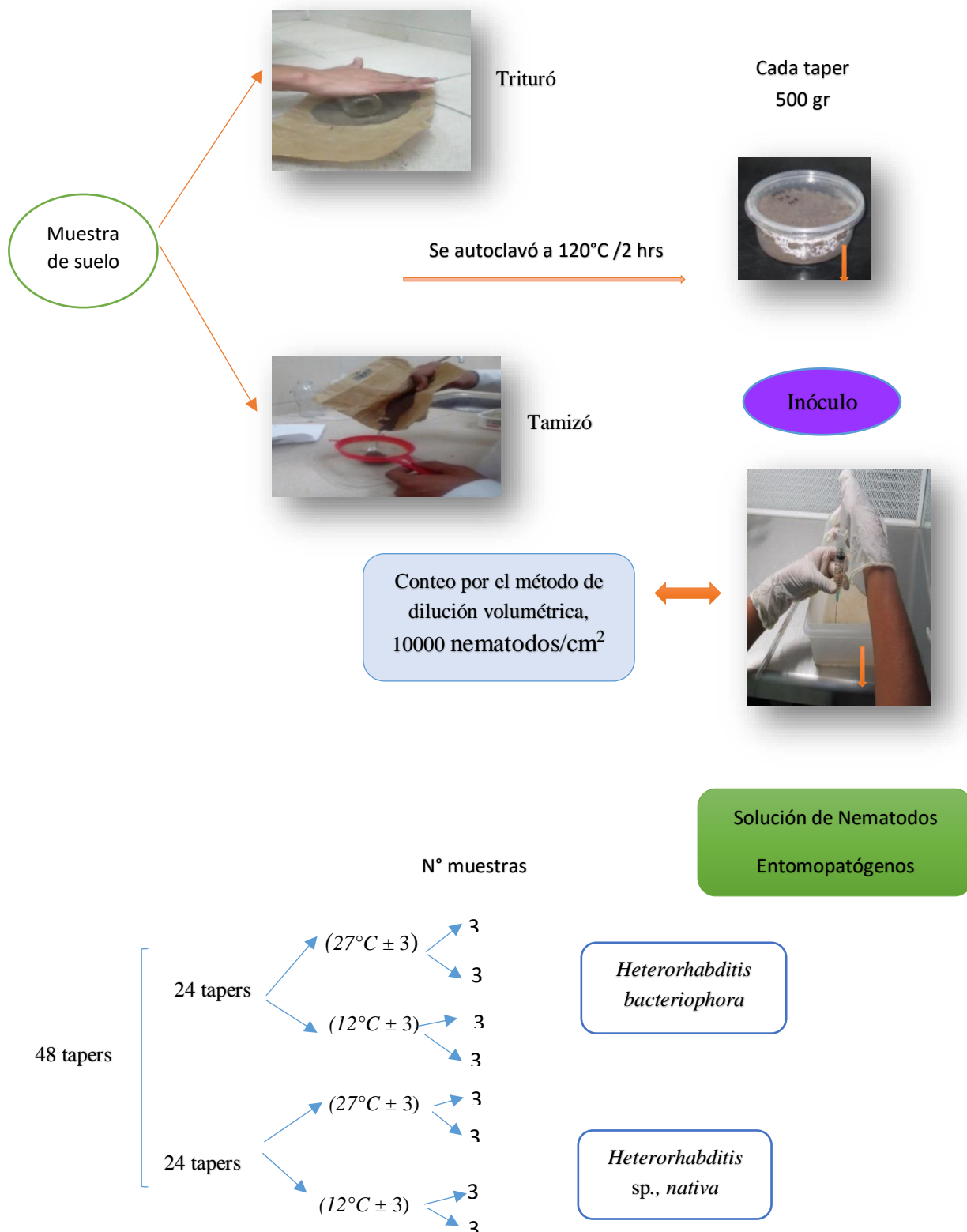


Figura 9. Procedimiento para la conservación de nematodos entomopatógenos: *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis sp., nativa* en el sustrato suelo en diferente temperaturas y tiempos de almacenamiento

Fuente: Elaboración propia

Cumplido los 15 días, se procedió abrir cada taper para colocar 10 larvas de *Galleria mellonella* por cada unidad experimental obtenidas de la crianza descrita anteriormente (Figura 5).

Posteriormente se procedió a evaluar durante 5 días, cada taper según la temperatura (12°C y 27°C) y en cada tiempo de almacenamiento de 15, 30, 45 y 60 días (Figura 10). Y se observó si estas larvas morían y cambiaban a un color característico (marrón oscuro), que demostraría que la mortalidad de larvas de *Galleria mellonella* ha sido causada por nematodos entomopatógenos (*Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp., *nativa*).

Este mismo procedimiento se realizó para los 30, 45 y 60 días de almacenamiento.



Figura 10. Procedimiento para la conservación de nematodos entomopatógenos *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp., nativa) en el sustrato suelo a diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento.

Fuente: Elaboración propia

- ***Conservación en sustrato agar***

Se pesó 2gr de agar nutritivo y se diluyó cada gramo en un litro de agua destilada debidamente esterilizada, se empleó para esto dos matraces de 1000 ml. Una vez diluido el agar, fueron ubicados en autoclave por un período de 2 horas. Paralelo a esto, se esterilizó 48 placas Petri durante 2 horas 30 minutos, a continuación se sirvió el agar en todas las 48 placas Petri en la cámara de flujo laminar, al mismo tiempo las placas Petri se marcaron indicando la especie (24 placas Petri para *Heterorhabditis bacteriophora* y 24 placas Petri para *Heterorhabditis* sp., *nativa*), temperatura (12°C y 27°C) y tiempos de almacenamiento de 15, 30, 45 y 60 días (Figura 11).

Al igual que el sustrato del suelo se hizo el conteo por el método de dilución volumétrica 10000 nematodos/cm². Inmediatamente se inoculó 5,52 ml de la solución madre en *Heterorhabditis bacteriophora* y 7,35 ml en *Heterorhabditis* sp., *nativa* en cada una de las unidades experimentales. De ahí las placas Petri fueron selladas con parafilm y marcadas para distinguir cada especie, temperatura (12°C y 27°C) y tiempos de almacenamiento de 15, 30, 45 y 60 días (Figura 11).

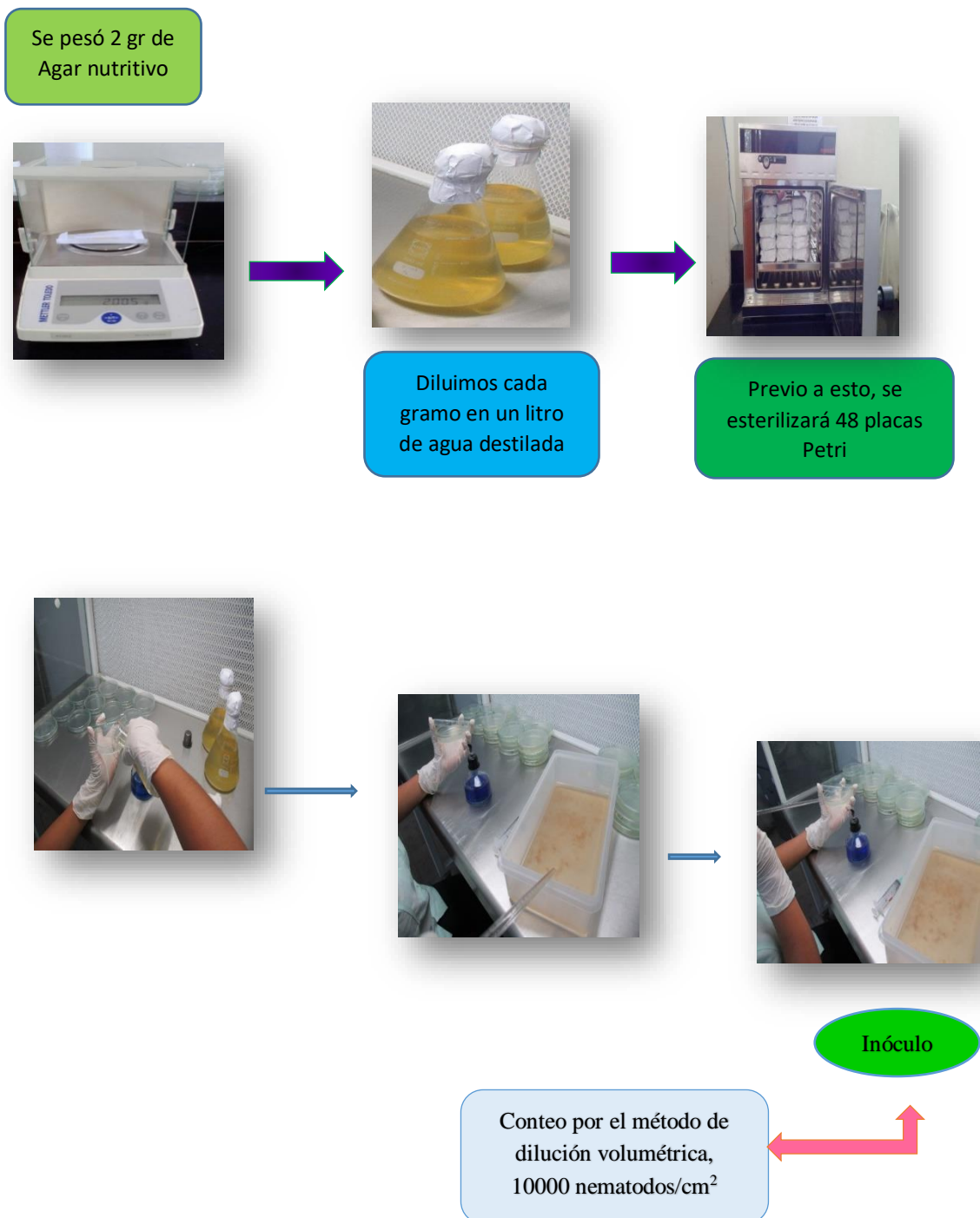


Figura 11. Procedimiento para la conservación de nematodos entomopatógenos *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp., nativa en el sustrato de agar a dos temperaturas y cuatro tiempos de almacenamiento.

Fuente: Elaboración propia

Al cumplirse los 15 días de almacenamiento, se tomaron las muestras marcadas de esos días y se observó cada placa Petri al estereoscopio para verificar si había nematodos vivos. Luego de esto, utilizamos una licuadora para disolver el agar que estaba semisólido y se le adicionó 10 ml de agua destilada.

Una vez licuado el agar, las placas Petri de *Heterorhabditis bacteriophora* y de *Heterorhabditis* sp., *nativa* fueron separadas de acuerdo a las temperaturas ($27^{\circ}\text{C} \pm 3$ y $12^{\circ}\text{C} \pm 3$) y tiempos de almacenamiento (15, 30, 45 y 60 días). Posteriormente usamos 10 larvas de *Galleria mellonella*, también utilizamos recipientes de plástico (30 cm de largo x 25 cm de ancho), papel toalla, jeringas para cada especie; finalmente se hizo la inoculación a estas larvas según su periodo de tiempo establecido de 15, 30, 45 y 60 días (Figura 12).

Este mismo procedimiento se realizó para los 30, 45 y 60 días de almacenamiento.

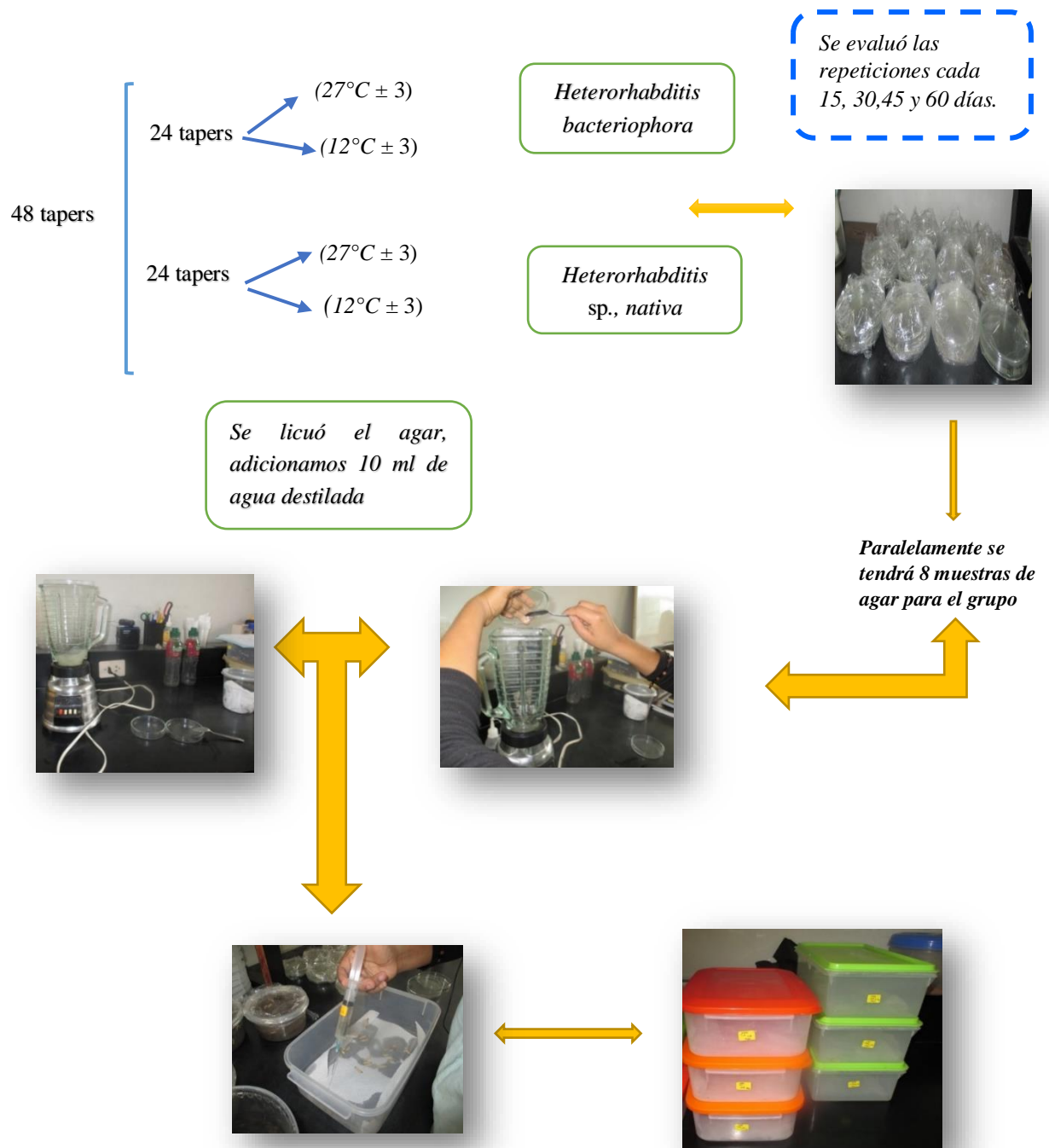


Figura 12. Procedimiento para la conservación de nematodos entomopatógenos: *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis sp., nativa* en el sustrato suelo a diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento.

Fuente: Elaboración propia

○ ***Conservación en sustrato esponja***

Se cortaron 48 esponjas de 3 cm² cada una y se esterilizó en papel kraft. Por consiguiente utilizamos 48 matraces estériles de 250 ml y en estos se colocaron 1 esponja por cada matraz. Una vez preparado el material, se efectuó el conteo de los nematodos por el método de dilución volumétrica 10000 nematodos/cm², después se inoculó 5,52 ml de la solución madre en *Heterorhabditis bacteriophora* y 7,35 ml en *Heterorhabditis* sp., *nativa* en cada una de las unidades experimentales, prontamente sellamos y marcamos las muestras para distinguir cada especie, la temperatura y el tiempo de almacenamiento (Figura 13).

Al cumplirse los 15 días de almacenamiento, se tomaron las muestras marcadas de esos días y se exprimió cada esponja en una placa Petri estéril, esto se realizó para cada unidad experimental, tanto las muestras de *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp., *nativa*.

A continuación se observó cada placa Petri al estereoscopio para verificar si había nematodos vivos. Realizado esto, se ejecutó la inoculación para lo cual se necesitó larvas de *Galleria mellonella*,

Lo que se hizo fue colocar en cada taper 10 larvas de *Galleria mellonella*, se hizo la inoculación y fueron cubiertas con papel toalla, estos recipientes de plástico se taparon correctamente y se acondicionaron para que a partir del día siguiente evaluáramos por cinco días. Así se empleó las demás muestras al cumplir 30, 45 y 60 días respectivamente (Figura 13).

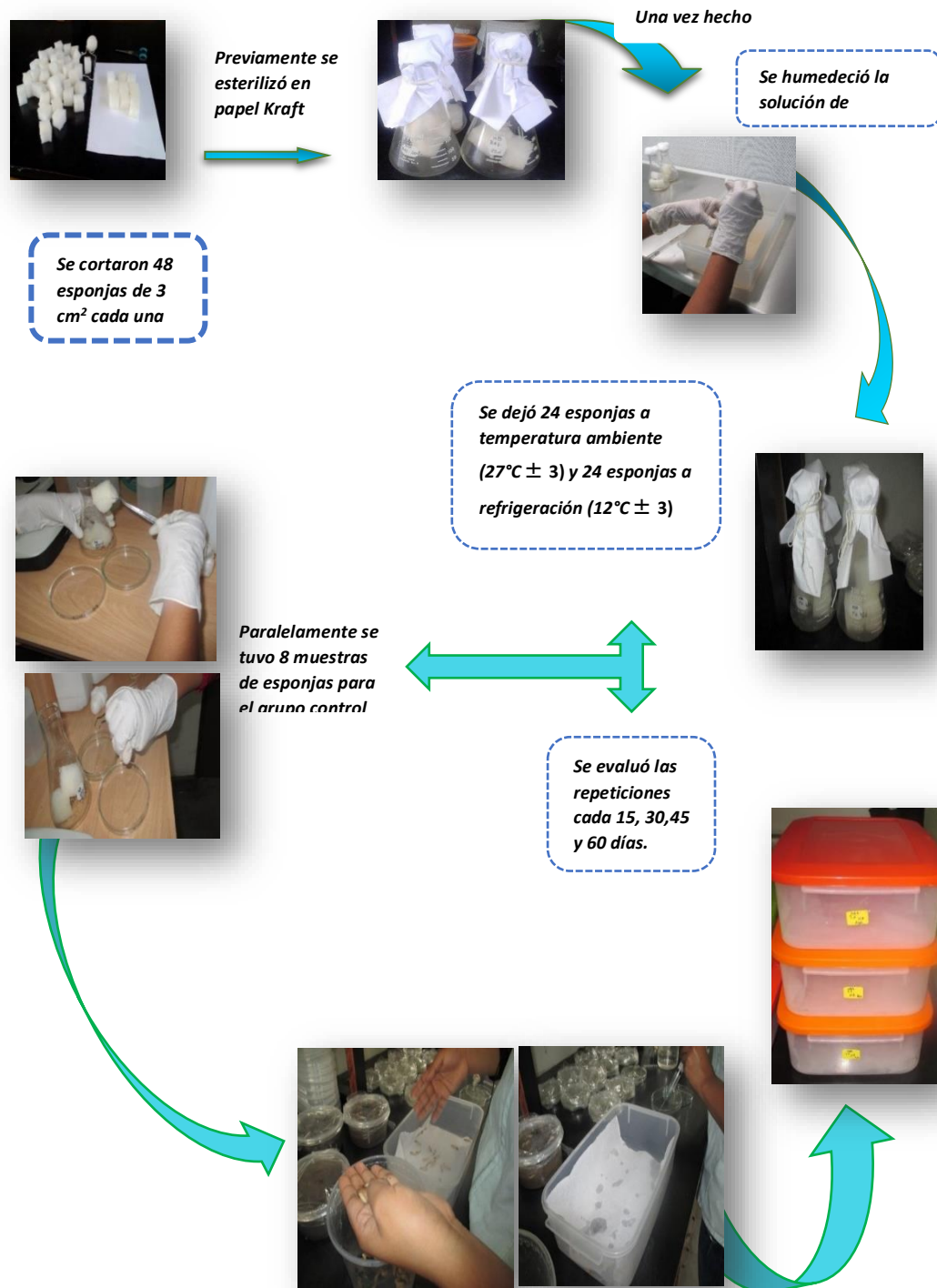


Figura 13. Procedimiento para la conservación de nematodos entomopatógenos: *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp., nativa en el sustrato esponja en diferente temperaturas y tiempos de almacenamiento.

Fuente: Elaboración propia

4.2.7. Mortalidad de larvas de *Galleria mellonella* por nematodos entomopatógenos

Después de 24 horas de haber colocado las larvas de *Galleria mellonella* a cada uno de los sustratos que contenían solución de nematodos entomopatógenos, se procedió a registrar a diario el número de larvas de *Galleria mellonella* muertas durante cinco días y el número de pupas eclosionadas durante esos días (tiempo estimado para la eclosión de las pupas de este insecto a una temperatura de 12°C y 27°C).

Con estos datos se calculó el porcentaje de mortalidad utilizando la fórmula de Duso *et al.* (2008):

$$\% M = \frac{NMF}{NVI} \times 100$$

%M = Porcentaje de mortalidad del tratamiento

NMF = Número de individuos muertos al final del estudio

NVI = Número de individuos vivos al inicio del estudio

4.2.8. *Análisis estadístico*

Para realizar nuestro análisis estadístico primero se depuraron los datos y evaluamos el comportamiento de nuestras variables para ver si seguían una distribución normal. Se utilizó el Programa SPSS 23 y a través de este programa comprobamos anormalidades en nuestras variables, y para ello utilizamos un histograma de frecuencia que mostraba la anormalidad.

Se realizó el Análisis de varianza de un factor (ANOVA) con el programa SPSS V.23 con los datos transformados para un nivel de significancia de 95%, además se utilizó también la Prueba de Tukey y de Pearson.

V. RESULTADOS

5.1. Calcular la mortalidad de larvas de *Galleria mellonella* por nematodos entomopatógenos (*Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp., *nativa*) en tres sustratos de conservación (suelo, agar y esponja).

Para evaluar la conservación de los nematodos entomopatógenos (*Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp., *nativa*) en tres sustratos a diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento, se calculó la mortalidad de larvas de *Galleria mellonella*.

Realizamos cuatro ensayos (15, 30, 45 y 60 días), en cada ensayo se utilizaron 180 larvas de *Galleria mellonella* para *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp., *nativa* respectivamente. Se hicieron tres repeticiones en cada intervalo de tiempo y temperatura establecida para cada especie, en cada tratamiento se colocaron 10 larvas para cada unidad experimental, de esta manera se calculó la mortalidad de estas larvas infestadas por nematodos entomopatógenos (*Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp., *nativa*), en las diferentes sustratos de conservación (suelo, agar y esponja).

En la tabla 2 se observa que el mayor porcentaje de mortalidad de larvas de *Galleria mellonella* por *Heterorhabditis bacteriophora* se presenta desde los 15 - 30 días en los 3 sustratos utilizados; siendo el sustrato con mayor porcentaje de mortalidad el de esponja con 96,6% a una temperatura de 12°C al igual que el sustrato de agar con 86,6% a una temperatura de 12°C, mientras que el suelo muestra una mortalidad de 76,6% a una temperatura de 12°C. A partir de los 45 días hay un descenso en los niveles de mortalidad; mostrando que el sustrato de la esponja tiene un 56,6% - 20%, el agar presenta un 43,3% - 36,6% y el suelo tiene un 43,3% - 26,6%, a las temperaturas

de 12°C y 27°C respectivamente. Asimismo, se presenta las fig.14, 15 y 16 de suelo, agar y esponja respectivamente; donde se observa larvas en desecación, otras con estadíos de pupa y larvas sin ningún efecto del nematodo.

Similar comportamiento se observó con *Heterorhabditis* sp., *nativa* (tabla 3), donde los niveles con mayor mortalidad de larvas de *G. mellonella* por *Heterorhabditis* sp., *nativa* se manifiesta en el lapso de 15 – 30 días, un 93,3% de mortalidad a 12°C para esponja, un 86,6% de mortalidad a 12°C para agar, y el suelo.

Entre los 45 – 60 días descendió la mortalidad de larvas; al igual que los datos obtenidos con *Heterorhabditis bacteriophora*, se muestra un 26,6% de mortalidad a 12°C para esponja, un 23,3% de mortalidad a 12°C para agar, y un 36,6% de mortalidad a 12°C para suelo, presentándose también las figuras 17,18 y 19 donde se vuelve a observar los mismos resultados, en el que las figuras 14 y 17 muestran la mortalidad de larvas de *G. mellonella* por desecación en muestras de suelo, debido a que el suelo no estaba totalmente humedecido, la textura del suelo no estaba completamente fina, serían las posibles causas; además en las figuras que se observan presentan las larvas de *G. mellonella* en estadio de pupa, a causa de que estas larvas estaban muy viejas, su desarrollo continuó a pesar de la inoculación.

Tabla 2. Porcentaje de mortalidad de larvas de *G. mellonella* por *Heterorhabditis bacteriophora*

<i>Heterorhabditis bacteriophora</i> (HBA)						
	Sustrato	temperatura	15 d	30 d	45 d	60d
Mortalidad de larvas	Agar	12°C	86,6 %	86,6%	43,3%	13,3%
		27°C	66,6%	66,6%	36,6%	3,3%
	Suelo	12°C	76,6%	73,3%	43,3%	10%
		27°C	63,3%	53,3%	26,6%	3,3%
	Esponja	12°C	96,6%	86,6%	56,6%	10%
		27°C	86,6%	83,3%	20%	10%

Tabla 3. Porcentaje de mortalidad de larvas de *G. mellonella* por *Heterorhabditis* sp., nativa

<i>Heterorhabditis</i> sp., nativa (HB)						
	Sustrato	temperatura	15 d	30 d	45 d	60d
Mortalidad de larvas	Agar	12°C	86,6%	86,6%	23,3%	6,6%
		27°C	73,3%	66,6%	16,6%	3,3%
	Suelo	12°C	86,6%	76,6%	36,6%	13,3%
		27°C	63,3%	73,3%	20%	3,3%
	Esponja	12°C	93,3%	90%	26,6%	6,6%
		27°C	86,6%	86,6%	30%	3,3%



Figura 14. Mortalidad de larvas de *Galleria mellonella* por *Heterorhabditis bacteriophora*, en suelo (A).ensayo de 15 días. (B) ensayo de 30 días. (C) ensayo de 45 días. (D) ensayo de 60 días.

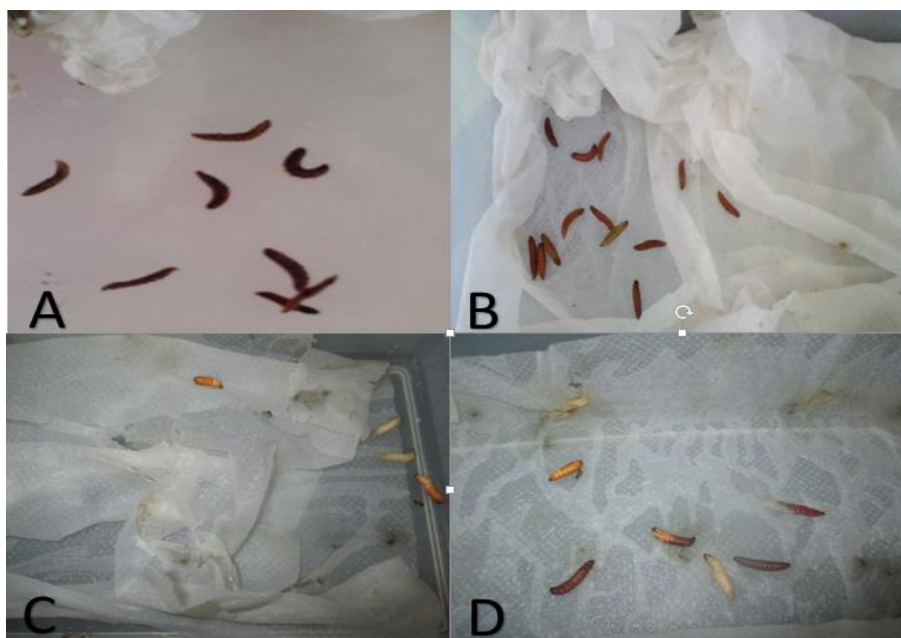


Figura 15. Mortalidad de larvas de *Galleria mellonella* por *Heterorhabditis bacteriophora*, en agar (A).ensayo de 15 días. (B) ensayo de 30 días. (C) ensayo de 45 días. (D) ensayo de 60 días.



Figura 16. Mortalidad de larvas de *Galleria mellonella* por *Heterorhabditis bacteriophora*, en esponja (A).ensayo de 15 días. (B) ensayo de 30 días. (C) ensayo de 45 días. (D) ensayo de 60 días.



Figura 17. Mortalidad de larvas de *Galleria mellonella* por *Heterorhabditis* sp., nativa en suelo (A).ensayo de 15 días. (B) ensayo de 30 días. (C) ensayo de 45 días. (D) ensayo de 60 días.



Figura 18. Mortalidad de larvas de *Galleria mellonella* por *Heterorhabditis* sp., **nativa en agar** (A).ensayo de 15 días. (B) ensayo de 30 días. (C) ensayo de 45 días. (D) ensayo de 60 días.

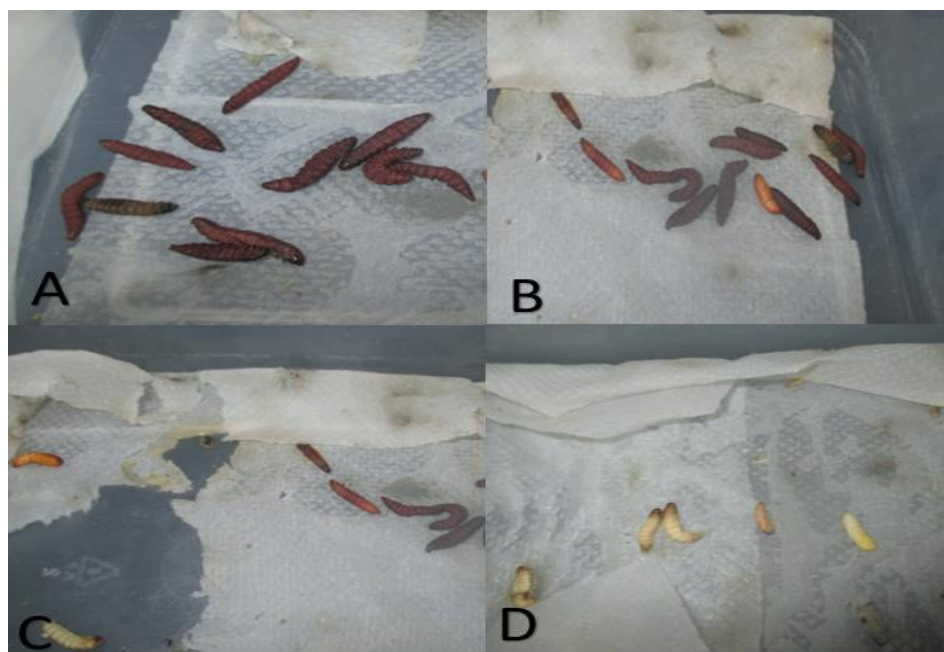


Figura 19. Mortalidad de larvas de *Galleria mellonella* por *Heterorhabditis* sp., **nativa en esponja** (A).ensayo de 15 días. (B) ensayo de 30 d. (C) ensayo de 45 d. (D) ensayo de 60 d.

5.2. Calcular la mortalidad de larvas de *Galleria mellonella* por nematodos entomopatógenos (*Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp., *nativa*) a diferentes tiempos de almacenamiento y dos temperaturas.

Se efectuó el análisis estadístico entre los sustratos, temperatura y tiempo de almacenamiento utilizándose el análisis de varianza, Prueba de Tukey y Prueba de Pearson.

Al realizar el análisis de varianza de los nematodos entomopatógenos (*Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp., *nativa*), en la tabla 4 se observa que el grado de significancia es $P = 0,745$; lo que indica que entre los nematodos entomopatógenos no tienen diferencia significativa, por tanto son similares en su acción letal sobre las larvas de *Galleria mellonella*.

Tabla 4. *Análisis de varianza de los nematodos entomopatógenos (*Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp., *nativa*)*

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1,174	1	1,174	,107	,745
Dentro de grupos	1562,986	142	11,007		
Total	1564,160	143			

En la tabla 5 se presenta el análisis estadístico es a nivel de sustratos de conservación, en la cual se observa que el nivel de significancia fue $P = 0,363$ demostrando que no hay diferencia significativa, por lo tanto los 3 sustratos son similares con respecto a su efecto de conservación de los nematodos entomopatógenos (*Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp., *nativa*).

Tabla 5. Análisis de varianza de los sustratos de conservación

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	22,347	2	11,174	1,022	,363
Dentro de grupos	1541,813	141	10,935		
Total	1564,160	143			

Los resultados del análisis de varianza para las temperaturas a 12°C y 27°C fue algo diferente ya que se muestra un grado de significancia de $P = 0,041$ por lo tanto a estas temperaturas que han sido expuestas las larvas de *Galleria mellonella* con nematodos entomopatógenos (*Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp., *nativa*) son diferentes significativamente.

Tabla 6. Análisis de varianza de un factor de las temperaturas (12°C y 27°C)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	45,563	1	45,563	4,260	,041
Dentro de grupos	1518,597	142	10,694		
Total	1564,160	143			

En la tabla 7, se presenta el análisis estadístico con respecto a los tiempos de almacenamiento (15, 30, 45 y 60 días) destacando un nivel de significancia de $P = 0,000$, lo cual revela que los tiempos de almacenamiento son diferentes significativamente; por lo tanto la mortalidad de larvas de *Galleria mellonella* por *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp., *nativa* depende del tiempo de almacenamiento. Para verificar que tiempo de almacenamiento es el que se diferencia, se realizó la Prueba de Tukey (Tabla 8) que nos muestra que no hay diferencia

significativa entre los 15 y 30 días, pero si hay diferencia significativa con respecto a los 45 y 60 días de almacenamiento.

Tabla 7. *Análisis de varianza de los tiempos de almacenamiento*

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1387,299	3	462,433	366,053	,000
Dentro de grupos	176,861	140	1,263		
Total	1564,160	143			

Tabla 8. *Prueba de Tukey de los tiempos de almacenamiento*

tiempo	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
60días	36	,72		
45días	36		3,17	
30días	36			7,75
15días	36			8,06
Sig.		1,000	1,000	,657

Todos los resultados antes expuestos se ratifican en la Prueba de Pearson (Tabla 9) en donde se observa que la mortalidad de larvas de *G. mellonella* por nematodos entomopatógenos (*Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp., nativa) depende de la variable tiempo y temperatura, pero se intensifica más la dependencia del tiempo, por otra parte las variables de los sustratos de conservación y los nematodos entomopatógenos son independientes.

Tabla 9. La prueba de correlación de Pearson

		Correlaciones				
		Larvas muertas	nematodos	sustrato	tiempo	temperatura
Larvas muertas	Correlación de Pearson	1	-,027	,083	-,902**	-,171*
	Sig. (bilateral)		,745	,325	,000	,041
	N	144	144	144	144	144
nematodos	Correlación de Pearson	-,027	1	,000	,000	,000
	Sig. (bilateral)	,745		1,000	1,000	1,000
	N	144	144	144	144	144
sustrato	Correlación de Pearson	,083	,000	1	,000	,000
	Sig. (bilateral)	,325	1,000		1,000	1,000
	N	144	144	144	144	144
tiempo	Correlación de Pearson	-,902**	,000	,000	1	,000
	Sig. (bilateral)	,000	1,000	1,000		1,000
	N	144	144	144	144	144
temperatura	Correlación de Pearson	-,171*	,000	,000	,000	1
	Sig. (bilateral)	,041	1,000	1,000	1,000	
	N	144	144	144	144	144

** . La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral).
 * . La correlación es significativa en el nivel 0,05 (bilateral).

Al finalizar cada ensayo a los 15, 30, 45 y 60 días, seleccionamos larvas muertas de *Galleria mellonella* de color marrón oscuro o anaranjado probablemente infestados por nematodos entomopatógenos de *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp., *nativa* para corroborar se instalaron en cámaras húmedas o Trampas White modificada, y se comprobó que en los primeros días emergían infectivos juveniles de NEPs, también verificamos con la disección de las larvas de *Galleria mellonella* muertas (Figura 21).

Se utilizó el estereoscopio para así observar a un mayor campo a los nematodos entomopatógenos que se encontraban dentro de las larvas. Al abrir las larvas se encontró en la parte del abdomen presencia de nematodos, conservándose en los

sustratos suelo, agar y esponja con una temperatura de 12°C y 27 °C y diferentes tiempos de almacenamiento.

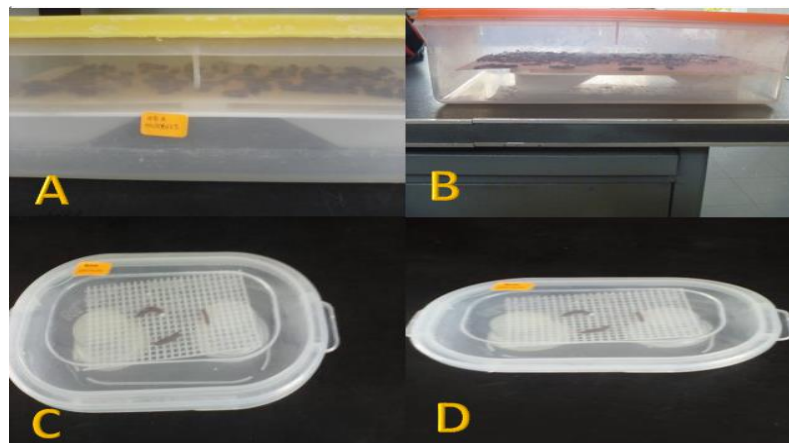


Figura 20. Cámara húmeda A – C *Heterorhabditis bacteriophora* y B – D. *Heterorhabditis* sp., *nativa*

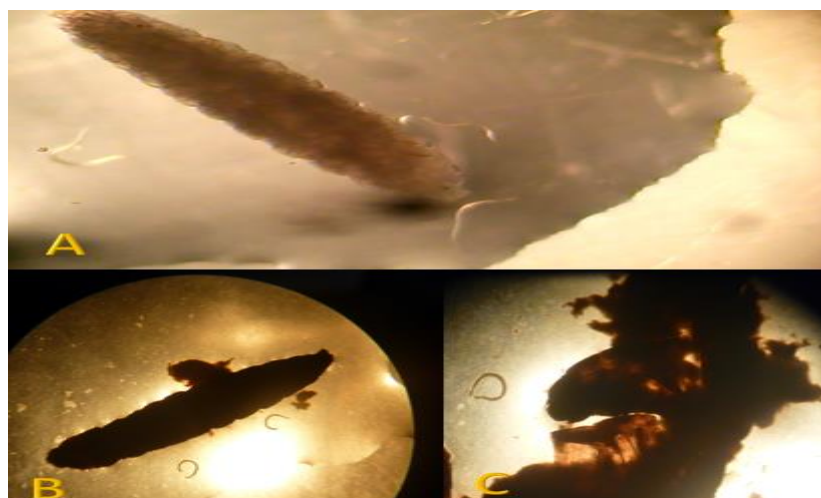


Figura 21. A. Disección de larva muerta por *Heterorhabditis bacteriophora* y B – C. disección de la larva muerta por *Heterorhabditis* sp., *nativa* observada en el estereoscopio, en laboratorio -INIA.

VI. DISCUSIÓN

La presente investigación nos ha permitido evaluar la conservación de los nematodos entomopatógenos (*Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp., *nativa*) en tres sustratos a diferentes tiempos de almacenamiento y dos temperaturas en condiciones de laboratorio, la que se discute en los acápite siguientes:

Los resultados mostraron que la conservación de los nematodos entomopatógenos *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp., *nativa* después de 15, 30, 45 y 60 días de almacenamiento; con tres repeticiones, mayormente dependió de la temperatura y el tiempo de almacenamiento (tabla 6 y 7). Sin embargo para el caso de los sustratos (tabla 5) no hubo diferencia significativa pero si se observó un alto porcentaje de mortalidad de *Galleria mellonella* con el sustrato esponja tanto para *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp., *nativa* (tabla 2 y 3). Según los resultados expuestos, observamos que la conservación en esponja fue el sustrato que ofreció, mejores condiciones, resultados similares a los obtenidos por Grewal en el año 1998, lo único que modificamos fue el recipiente donde se colocaron las muestras que en este caso se utilizó el matraz de Erlenmeyer y revelaron mejores resultados. Grewall y Peters (2005) en cambio usó una sola pieza de esponja donde se colocó de 5-25 x 10⁶ Juveniles, se introdujo a su vez en una bolsa de polietileno, de este modo, se pudo almacenar durante 1-3 meses a 5-10 °C.

En el sustrato del agar, la concentración fue de 1 gr por cada litro, el medio fue agar nutritivo en estado semisólido, a cada placa Petri se colocó 18 ml de agar, las muestras en los diferentes intervalos de tiempo conservaron su consistencia, el sustrato dio resultado a pesar que las muestras a temperatura ambiente mostraban cierta resequedad, pese a esto se logró la mortalidad de larvas de *G.mellonella* por

Heterorhabditis bacteriophora y *Heterorhabditis* sp., nativa en 76,6% - 86,6% respectivamente hasta los 30 días de almacenamiento.

Investigaciones de Hussein, Adel y Gelbic (2012), con respecto al sustrato agar, sirvió de referente en este estudio en donde se aplicaron nematodos en formulaciones de agar al 4%, 2%, 1% y 0,5% de concentración, la cual se hizo una comparación en base a la aplicación de control de los nematodos en agua para su supervivencia. Se concluyó que este 1% de concentración era más adecuado para mantener la viabilidad y la invasión de nematodos a los insectos.

Con respecto al sustrato del suelo fue considerado en esta evaluación ya que según Wallace (1958), reportó que es importante estudiarlo porque hay un tamaño de partícula necesario para movimiento de cada especie de nematodo. Aparentemente el tamaño de poro afecta la facilidad con la que los nematodos pueden desplazarse a través del suelo. Un nematodo no puede moverse entre las partículas de suelo cuando el diámetro de los poros es menor que el ancho del cuerpo del nematodo (Nas, 1978). En este trabajo las muestras de suelo fueron extraídas del Caserío Montegrande (Reque) por ser suelos aptos para cultivos agrícolas; sin embargo, hubo ciertas complicaciones porque al humedecer el suelo se formaron gránulos gruesos, para obtener partículas finas en todas las muestras, lo que pudo conllevar a que la mortalidad en larvas infestadas no se dio completamente.

La temperatura tiene efectos profundos sobre los aspectos biológicos de los nematodos entomopatógenos al afectar la supervivencia, infectividad y patogenicidad (Glazer *et al.*, 1996). Así como, el desarrollo, maduración y reproducción (Long *et al.*, 2000), según Griffin (1973) el rango de temperatura óptima para la actividad del género *Heterorhabditis* es de 20°C a 25°C, que es similar a la óptima para la actividad de juveniles infecciosos de otros nematodos parásitos; es por esta razón, que en esta

investigación consideramos evaluar el efecto de la temperatura a 12°C y 27°C, de acuerdo a los resultados, la temperatura de 12°C fue la que mejor resultados ofreció a diferencia de la temperatura ambiente de 27°C donde se registró 96,6% - 86,6% proporcionalmente a los 15 y 30 días de almacenamiento.

En investigaciones se reporta que temperaturas superiores de 35°C a 37°C interrumpen el ciclo de vida, siendo la óptima 24°C (Nguyen y Smart, 1992). Sin embargo, de acuerdo al presente estudio, ese rango se tomó como referente y se manejaron dos tipos de temperaturas una de 12°C y 27°C.

También se evaluaron los tiempos de almacenamiento a los 15, 30, 45 y 60 días, el porcentaje de mortalidad de larvas de *Galleria mellonella* por estos nematodos, solo resultó significativamente diferente hasta los 15 y 30 días. En los 45 – 60 días descendieron los niveles de mortalidad de larvas de *Galleria mellonella* por *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp., *nativa*, las causas más comunes pudieron ser que estas larvas de *Galleria mellonella* hayan estado demasiadas viejas por tanto han seguido desarrollándose sin que el nematodo haga efecto.

Las larvas muertas de *Galleria mellonella* por *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp., *nativa* fueron colocadas en las trampas White modificada para ver si estas larvas contenían los nematodos entomopatógenos. Se cosecharon los nematodos que emergieron de la trampa, cambiando diariamente el agua destilada. La emergencia de los infectivos juveniles varió de acuerdo a la cepa aislada del nematodo entomopatógeno. También se realizó la disección de las larvas de *Galleria mellonella*, muertas por los nematodos *entomopatógenos* tanto de *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp., *nativa* (Figura 21).

VII.CONCLUSIONES

- De los tres sustratos evaluados para la conservación de nematodos entomopatógenos (*Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp., *nativa*) la esponja fue el sustrato con el que se obtuvo el mayor porcentaje de mortalidad de larvas de *G. mellonella* por nematodos (96,6% por *Heterorhabditis bacteriophora* y 93,3% por *Heterorhabditis* sp., *nativa*) a los 15 días de almacenamiento, pero sin diferencia significativa con respecto a los sustratos agar y suelo.
- El porcentaje de mortalidad de larvas de *G.mellonella* por los nematodos entomopatógenos con respecto a los tiempos de almacenamiento fue significativamente diferente ($P = 0,41$). El mayor porcentaje se presentó a los 15 días de almacenamiento con 90% y 80% con respecto a los nematodos *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp., *nativa* respectivamente.
- El porcentaje de mortalidad de larvas de *G.mellonella* por los nematodos entomopatógenos con respecto a las temperaturas 12°C y 27°C mostraron un grado de significancia de $P = 0,041$. El mayor porcentaje de mortalidad (96,6% y 93,3%) para *Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp., *nativa* respectivamente, se logró a los 12°C.

VIII. RECOMENDACIONES

Al concluir el presente trabajo de investigación se recomienda:

- Evaluar condiciones similares de los tratamientos realizados, empleando otros sustratos para almacenar nematodos, con el objetivo de mejorar la supervivencia, en laboratorio; además se debe utilizar larvas de *Galleria mellonella* en su estado juvenil, para así evitar que empupen rápidamente.
- Adicionar otros ingredientes al sustrato del agar nutritivo, como el gliceraldehído, peptona u otro aditivo para enriquecer el medio para así evitar la deshidratación y desecación.
- Este trabajo de investigación la evaluación de la conservación de los nematodos entomopatógenos (*Heterorhabditis bacteriophora* y *Heterorhabditis* sp., *nativa*) se demostró mediante el porcentaje de mortalidad de larvas de *G. mellonella*, por lo que se recomienda seguir realizando estudios más profundos en base a la patogenicidad de estas especies.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agrios, G.N. (2008). Fitopatología. Mexico D.F. Limusa.

Andalo, V., Sousa, R., Molina, J., & Moino, A. (2010). Sustratos para el almacenamiento de nematodos entomopatógenos (*Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae*). *Revista Scientia Agrícola*. 67 (3).

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90162010000300013

Arias, M., & Murillo, M. (2013). Evaluación de dos métodos de extracción de la bacteria simbiote *Photorhabdus luminescens* del nemátodo entomopatógeno *Heterorhabditis bacteriophora* (Tesis de Licenciatura). Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. Honduras.

<http://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/1848/1/CPA-2013-094.pdf>

Argotti, E., Gallegos, P., Alcazar, J., & Kaya, H. (2010). Caracterización ecológica de nematodos entomopatógenos del género *Heterorhabditis* aislados de *Tecia solanivora*. Boletín Técnico 9, Serie Zoológica 6: 173-184, Laboratorios IASA I Sangolquí – Ecuador

[http://www.espe.edu.ec/portal/files/ERevSerZoologicaNo2/9\(6\)/13Argotticara_caterizacionok.pdf](http://www.espe.edu.ec/portal/files/ERevSerZoologicaNo2/9(6)/13Argotticara_caterizacionok.pdf)

Castillo, C., Gallegos, P., Asaquibay, C., & Oña, M. (2010). Guía de prospección y multiplicación de nematodos entomopatógenos para el control biológico de plagas en Ecuador. Estación experimental Santa Catalina. Ecuador – Quito. 88(15).

<http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/documentos/Plagas%20en%20Ecuador.pdf>

Chica, E. (2010). *Reproducción masiva de nematodos entomopatógenos en laboratorio y su evaluación en el control del barrenador de la raíz (Sagalassa válida W.), en el cultivo de Palma Aceitera (Elaeis guineensis Jacq.)* (Tesis de grado). Universidad Técnica de Manabí. Ecuador.

<http://repositorio.utm.edu.ec/bitstream/50000/3857/1/reproduccion%20masiva%20de%20nemátodos%20entomopatogenos%20en%20laboratorio%20y%20su%20evaluacion%20en%20el%20control%20del%20barrenador%20de%20la%20raiz%20sagalassa%20valida%20w%20en%20el%20cultivo%20de%20palma%20aceitera%20elaeis%20guineensis%20jacq.pdf>

Doucet, M., Bertolotti, M., Cagnolo, S., & Lax, P. nematodos entomofilicos de la Provincia de Córdoba, Argentina.

http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/27717/Documento_completo.pdf?sequence=1

García, A. (2006). *Formulación de bioinsecticidas a base de nematodos entomopatógenos* (Tesis de grado). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Mexico.

<http://repository.uaeh.edu.mx/bitstream/bitstream/handle/123456789/11149/Formulaci%C3%B3n%20de%20bioinsecticidas%20a%20base%20de%20nemátodos%20entomapatogenos.pdf?sequence=1>

García, F. (2005). Agentes de control biológico de plagas: los nematodos entomopatógenos agentes de control de plagas. J. Jacas, P. Caballero & Jesús Avilla (Eds). *El control biológico de plagas y enfermedades: la sostenibilidad de la agricultura mediterránea* (pp. 87 – 99). Navarra: Universitat Jaume.

<https://books.google.com.pe/books?hl=es&lr=&id=4hZ0loEeCPUC&oi=fnd&pg=PA87&dq=supervivencia+de+nemátodos+entomopatogenos+glaser&ots=KIqBUy3UG8&sig=tPa->

qIWdG1Oe09KaJ3M7BWTRnMU#v=onpage&q=supervivencia%20de%20
Onemátodos%20entomopatogenos%20glaser&f=false

Georgis, R., & Kaya, H. (1998). Formulation of entomopathogenic nematodes. Dordrecht ,
Holanda: H.D.Burges .

http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-011-4926-6_9#close

Gradinarov, D., Petrova, E., Mutaftchiev, Y., & Karadjova, O. (2012). Distribution of
Entomopathogenic Nematodes of the *Genus Heterorhabditis* (Rhabditida:
Heterorhabditidae) In Bulgaria. *Nematol medit* . 40.173-180.

[http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:80_fCaK1ANAJ:www.researchgate.net/profile/Olia_Karadjova/publication/256471272_Distribution_of_entomopathogenic_nematodes_of_the_genus_Heterorhabditis_\(Rhabditida_Heterorhabditidae\)_in_Bulgaria/links/02e7e522eceed2c15000000.pdf+&cd=1&hl=es&ct=clnk&gl=pe](http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:80_fCaK1ANAJ:www.researchgate.net/profile/Olia_Karadjova/publication/256471272_Distribution_of_entomopathogenic_nematodes_of_the_genus_Heterorhabditis_(Rhabditida_Heterorhabditidae)_in_Bulgaria/links/02e7e522eceed2c15000000.pdf+&cd=1&hl=es&ct=clnk&gl=pe)

Grewall & Peters, A. (2005). Formulation and Quality. En P.S. Grewall, R. U.Ehlers &
D.I.Shapiro – llan (Eds), Nematodes as Biocontrol Agents (pp. 79 – 88).
USA.CAB International.

https://books.google.com.pe/books?hl=es&lr=&id=jfleY2IEb7MC&oi=fnd&pg=PA79&dq=Formulation+and+Quality.&ots=cjMYZUjgDm&sig=0KFLNb9M6sj43pWX6v_jo3ec5Pk#v=onpage&q=Formulation%20and%20Quality.&f=false

Hussein, H., Adel, M., & Gelbic, I. (2012). Efectividad del nematodo entomopatógeno
Steinernema feltiae en formulaciones de gel agar contra larvas del
Escarabajo de la Patata Colorado, *Leptinotarsa decemlineata* (Say.)
(Coleoptera: Chrysomelidae). *Cent. Eur. J. Biol.* 7 (1) .77-82.

Lozano, J. (2001). El estrés calórico en la expresión de las proteínas HSP70 HSP90 en nematodos entomopatógenos Rhabditida: *Steinernematidae*, *Heterorhabditidae* (Tesis de Doctorado). Universidad de Colima. Mexico.

http://digeset.ucol.mx/tesis_posgrado/Pdf/Julio%20Lozano%20Gutierrez.pdf

Magiorani, A., & Gudiño, S. (1996). Uso de nematodos entomopatógenos como una alternativa para el control de insectos plagas. Revista técnica Fonaiap Divulga. 53.

http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/FonaiapDivulga/fd53/nemátodos.ht

Medina, M., Salcedo, G., Tapia, E., Valdivieso, L., Canales, A., & Whu, M. (2009). Multiplicación y evaluación de la patogenicidad del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis bacteriophora* en larvas de picudo negro a nivel de laboratorio, *Revista de divulgación de la Dirección de Investigaciones y Proyectos Académicos*, PP 86- 96.

<http://revistadipa.ug.edu.ec/dipa/anterior/ediciones/RevistaDIPA2009.pdf>

Mejía, M., & Saenz, A. (2013). Ecological characterisation of the Colombian entomopathogenic nematode *Heterorhabditis* sp. SL0708. *Brazilian Journal of Biology*. 73 (2).

http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1519-69842013000200239&script=sci_arttext&tlng=es

Melo, E., Ortega, C., Gaigl, A., Ehlers, R., & Belloti, A. (2006). Evaluation of two commercial strains of entomonematodes as control agents of *Cyrtomenus bergi* Froeschner (Hemiptera: Cydnidae), *Revista Colombiana de Entomología*, 32(1), 31-38.

<http://www.scielo.org.co/pdf/rcen/v32n1/v32n1a05.pdf>

Melo, E., Ortega, C., Susurluk, A., Gaigl, A., & Bellotti, A. (2009). Poblaciones nativas de nematodos entomopatógenos (Rhabditida) en cuatro departamentos de Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*.35 (1): 28- 33.

<https://cgspace.cgiar.org/handle/10568/44367>

Méndez, A. (.2010). Entomofauna principal asociada a plantas de interés agrícola en la Provincia de las Tunas, Cuba. *Revista Científica y Académica Vigiendo*.1 (1): 7 – 15.

<http://www.unipacifico.edu.co/docs/rvijiando001.pdf#page=48>

Merino, L., & Francé, A. (2009). Nematodos entomopatógenos: Control biológico de insectos plaga de importancia económica. *Revista INIA Tierra Adentro*.24.

<http://www2.inia.cl/medios/biblioteca/ta/NR35946.pdf>

Molina, J., Moino, A., Sousa, R., Andalo, V., & Aparecida, L. (2006). Efecto de temperatura, concentración y tiempo de almacenamiento en la supervivencia de nematodos entomopatógenos. *Revista Colombiana de Entomología*. 32(1): 24-30.

<http://www.scielo.org.co/pdf/rcen/v32n1/v32n1a04>

Molina, J.P., & López, J.C. (2003).Supervivencia y parasitismo de nematodos entomopatógenos para el control de *Hypothenemus hampei Ferrari* (Coleoptera: Scolytidae) en frutos de café.Revista Bol. San. Veg. Plagas. 29: 523 – 533.

http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/Biblioteca/Revistas/pdf_plagas%20FBSVP-29-04-523-533.pdf

Morton, A., & García, F. (2008). Virulence of entomopathogenic nematodes to different stages of the flatheaded root borer, *Capnodis tenebrionis* (L.) (Coleoptera: Buprestidae). *Nematology*. 00(0): 1- 9.

<http://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/3705/amj1de1.pdf?sequence=1>

Papiel, I., & Vasquez, E. (1991). Cryopreservation of *Steinernema carpocapsae* and *Heterorhabditis bacteriophora*. *Journal of Nematology* .23(4).432-437.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2619178/pdf/432.pdf>

Perrera, A. (2009). *bacteriophora (Nematoda: Heterorhabditidae) para el control de larvas de Phyllophaga spp. (Coleoptera: Scarabaeidae)*. Tesis de pregrado. Zamorano Carrera de Ciencias Y Producción Agropecuaria: Honduras.

Quintero, M. (2003). Comparación en laboratorio de la patogenicidad de tres especies nativas de nematodos entomopatógenos (Rhabditida) sobre larvas del tercer instar de *Phyllophaga menetriesi* (Blanchard) (Coleoptera: Scarabaeidae). Tesis de grado. Universidad del Valle – Santiago de Cali.

<http://ciat->

library.ciat.cgiar.org/articulos_ciat/ipm/pdfs/Tesis_MPQuintero.pdf

Realpe, F., Bustillo, A., & López , J. (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.

[http://www.cenicafe.org/es/publications/arc058\(02\)142-157.pdf](http://www.cenicafe.org/es/publications/arc058(02)142-157.pdf)

- Rodríguez, M., Hernández, D., & Gómez, L. (2012). Nematodos entomopatógenos: elementos del desarrollo histórico y retos para su consolidación como biorreguladores en la Agricultura en Cuba. *Revista de Protección Vegetal*. 27 (3).
http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1010-27522012000300001&script=sci_arttext
- Rosales, L., Rodríguez, M., Enrique, R., Puente, L., & García, J. (2009). Cría masiva de nematodos entomopatógenos para el control de insectos plaga, 19 - 22.
<http://es.scribd.com/doc/56864785/Cria-nemátodos-entomopatogenos-7#scribd>
- Ruiz, F. (2009). Mejoramiento a la tolerancia al calor y a la desecación de tres nemátodos entomopatógenos (Tesis de Maestría). Instituto Politécnico Nacional: Centro Interdisciplinario de Investigación para el desarrollo regional, Unidad Oaxaca. Mexico.
http://tesis.bnct.ipn.mx/dspace/bitstream/123456789/4459/1/MEJORAMIENTO_TOLERANCIA.pdf
- Saénz, A. (2005). Importancia de los nematodos entomopatógenos para el control biológico de plagas en palma de aceite. *Revista Palmas*, 26(2): 41-57. Disponible en:
<http://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/1131/1131>
- Saénz, A., López, J & Galindo, L. (2011). Producción de nematodos entomopatógenos por métodos in vitro. *LevaScientia Colombia S.A.S.*
<http://es.scribd.com/doc/280593489/Produccion-de-nemátodos-entomopatogenos-por-metodos-in-vitro#scribd>
- Salas, M (2002). Distribución natural de nematodos entomopatógenos (Nematoda: *Steinernematidae* y *heterorhabditidae*) en sistemas agroecológicos de Zacatecas (tesis de grado). Universidad de Colima. Mexico.

Sánchez, G. (2001). *Potencial de heterorhabditis indica (rhabditida: heterorhabditidae) como estrategia de manejo de Copturus aguacatae (col: curculionidae) y phyllophaga spp. (Col: melolonthidae)* (Tesis de grado). Instituto Politécnico Nacional para el Desarrollo Integral Regional. Mexico.

<http://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/8011/Tesis%20-%20MA.%20GUADALUPE%20S%C3%81NCHEZ%20SAAVEDRA.pdf>

Sánchez, G., Cortez, H., & Acevedo, D. (2012). Infektividad de *Heterorhabditis indica* (Rhabditida: Heterorhabditidae) en adultos y larvas de gallina ciega (Coleoptera: Melolonthidae). *Revista Chapingo, serie Horticultura*. 18 (3).

http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1027-152X2012000300011&script=sci_arttext

Sicard, M., Hinsinger, J., Le, N., Pages, S., Boemare, N., & Mouliat, C. (2006). Interspecific competition between entomopathogenic nematodes (*Steinernema*) is modified by their bacterial symbionts (*Xenorhabdus*). *BMC Evolutionary Biology*. 6:68.

<http://www.biomedcentral.com/1471-2148/6/68>

Soler, D., Gómez, I., & Sánchez, I. (2003). Formulación de nematodos entomopatógenos. *Protección Vegetal*, 18: 7-14

<http://ernxocotlan.blogspot.pe/2014/03/soler-2003.html>

Stock, P., Barry, M., & Kaya, H. (1999). Distribution of entomopathogenic nematodes (*Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*) in natural habitats in California, USA. *Biodiversity and Conservation*. 8. 535-549.

http://ag.arizona.edu/plp/courses/Biology%20and%20Systematics%20of%20Nematodes_files/PDF%20Files/stock%20et%20al%5B1%5D.1999.pdf

Vásquez, E. (2012). Caracterización de nematodos entomopatógenos aislados del Valle de Guasave, Sinaloa, Mexico (Tesis de Maestría). Instituto Politécnico Nacional. Mexico.

<http://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/13140/ELVA%20LORENA%20VAZQUEZ%20MONTTOYA.pdf?sequence=1>

Yan *et al.*, (2012). Presencia natural de nematodos entomopatógenos (*Steinernematidae* y *Heterorhabditidae*) en suelo en Australia. Organización Internacional de Lucha Biológica (OILB).

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1440-6055.1986.tb01110.x/pdf>